

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III



TESIS DOCTORAL

Aggregatibacter actinomycetemcomitans en periodontitis:
prevalencia, variabilidad genética e implicaciones terapéuticas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María José Mínguez Arnau

Directores

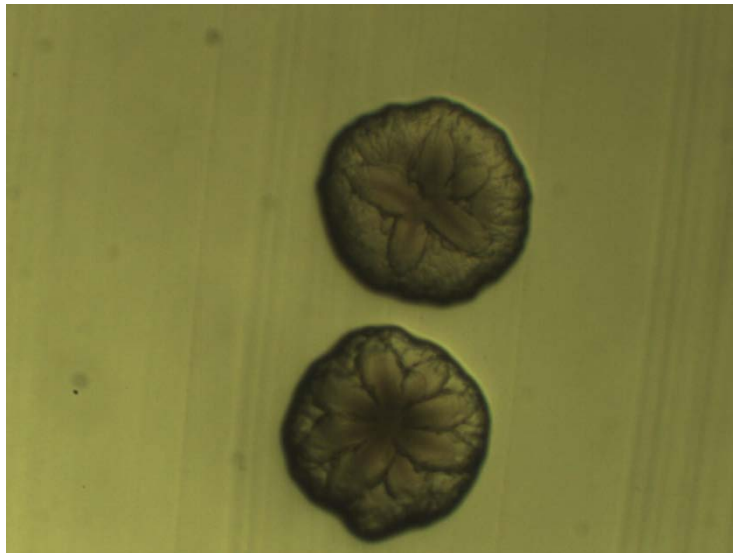
David Herrera González
Mariano Sanz Alonso

Madrid, 2018

Departamento de Estomatología III
Facultad de Odontología
Universidad Complutense de Madrid



***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EN PERIODONTITIS:
PREVALENCIA, VARIABILIDAD GENÉTICA E IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS.**



Tesis Doctoral

María José Mínguez Arnau

Dirigida por: Prof. Dr. D. David Herrera González

Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso

Departamento de Estomatología III
Facultad de Odontología
Universidad Complutense de Madrid



***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EN PERIODONTITIS:**
PREVALENCIA, VARIABILIDAD GENÉTICA E IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS.

María José Mínguez Arnau

Tesis Doctoral

Dirigida por: Prof. Dr. D. David Herrera González

Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso

A Marta y a Luis.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral ha supuesto para mí una carrera de fondo, en la que cada etapa ha supuesto un esfuerzo y una gran recompensa a la vez. Es el momento de agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado durante estos años:

Prof. David Herrera:

Como co-director de esta tesis. Por expresar mi capacidad de trabajo, enseñarme a ser crítica conmigo misma, por su entera dedicación en cada una de las etapas que ha tenido esta tesis doctoral y por hacer que la ilusión por el trabajo bien hecho estuviera siempre presente.

Prof. Mariano Sanz:

Como co-director de esta tesis. Por haberme incluido en este proyecto de investigación, para mí, apasionante. Y por haber apostado por mí desde mis primeros días en la Universidad Complutense. Por su rápida y eficaz ayuda en cada una de las etapas de este trabajo.

Estoy también agradecida a las ayudas económicas concretamente a la beca pre-doctoral de la Universidad Complutense de Madrid.

Al equipo de laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología: Itziar González y Ana O'Connor por su inmenso trabajo, desde la evaluación de las muestras recogidas en distintas ciudades de España y en Rabat (Marruecos) hasta la organización de todos los datos. En todo este proceso, gracias por haberme hecho disfrutar de lo que, para mí, fue la mejor etapa en mi paso por la Complutense. También a Mamen Roiz, por estar siempre pendiente y disponible para echarme una mano.

Quiero agradecer también a María Sánchez, Arancha Llama, M^a José Marín y Andrea Blasi, por el gran equipo que formamos durante la fase de trabajo del procesado de las muestras en cuyos resultados está basado este trabajo.

A mis amigas del Máster de Periodoncia, Carmen, Nerea, Merche y Estefanía, porque, con su apoyo y amistad, hicieron que los años del Máster fueran duros, pero maravillosos a la vez. Qué suerte haber coincidido con vosotras.

A mis padres, M^a José y Esteban, por haberme dado alas para volar y porque gracias a vuestra entrega y generosidad pude empezar este largo camino, del cual habéis estado siempre pendientes. Sin vosotros, esto no hubiera sido posible. Gracias de corazón.

A Marta y Santi, gracias por, aún en la distancia, estar siempre pendientes y conscientes de todo, por pelear conmigo en los momentos de flaqueza.

A Luis, por enseñarme con paciencia que esto es un camino largo y hacerme sentir fuerte y capaz.

Este trabajo también es de todos vosotros.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	PREFACIO	9
II.	RESUMEN	11
III.	INTRODUCCIÓN	19
	1. Enfermedades periodontales: clasificación y prevalencia	
	2. Importancia de las enfermedades periodontales y efectos a nivel local y sistémico	
	3. Etiología de las enfermedades periodontales	
	4. Patógenos periodontales	
	5. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	
	6. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	
	7. Tratamiento de las enfermedades periodontales	
	8. Resistencias a antimicrobianos sistémicos	
	9. Evaluación de las susceptibilidades antimicrobianas	
IV.	JUSTIFICACIÓN	47
V.	HIPÓTESIS	49
VI.	OBJETIVOS	51
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS. RESULTADOS	53
VIII.	DISCUSIÓN	129
IX.	CONCLUSIONES	149
X.	BIBLIOGRAFÍA	151

I. PREFACIO

La presente tesis doctoral está basada en los siguientes cuatro artículos:

Artículo 1: Mínguez M, Pousa X, Herrera D, Blasi A, Sánchez MC, León R, Sanz M (2014) Characterization and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates from a population of periodontitis patients in Spain. *Archives of Oral Biology* 59(12): 1359-67.

Artículo 2: Mínguez M, Ennibi OK, Pousa X, Lakhdar L, Abdellaoui L, Sánchez M, Sanz M, Herrera D (2016) Characterization of *A. actinomycetemcomitans* strains in subgingival samples from periodontitis subjects in Morocco. *Clinical Oral Investigations* 20(7): 1809-1818.

Artículo 3: Chahboun H, Mínguez M, Herrera D, Sanz M, Ennibi OK (2015) Bacterial profile of aggressive periodontitis in Morocco: a cross-sectional study. *BMC Oral Health* 24: 15-25.

Artículo 4: Mínguez M, Ennibi OK, Perdiguer P, Lakhdar L, Abdellaoui L, Sánchez M, Sanz M, Herrera D Antimicrobial susceptibilities of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* strains from periodontitis patients in Morocco. *International Journal of Antimicrobial Agents* (enviado para publicación).

II. RESUMEN

Introducción

Las enfermedades periodontales son un grupo de enfermedades inflamatorias de origen bacteriano que afectan a los tejidos de soporte del diente. La prevalencia de las dos formas más frecuentes de periodontitis (crónica y agresiva) varía sustancialmente entre países. De entre todas las especies bacterianas que están presentes en la cavidad oral, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* han mostrado una asociación fuerte con las periodontitis, de acuerdo a los criterios descritos por Socransky. *A. actinomycetemcomitans*, particularmente su cepa altamente virulenta, el clon JP2, ha demostrado aumentar el riesgo de sufrir periodontitis agresiva en adolescentes de la región del norte de África. Por ello, es razonable estudiar las diferencias en la prevalencia y variabilidad genética de dicho periodonto-patógeno en dos poblaciones distintas como España y Marruecos.

El tratamiento periodontal tiene como objetivo reducir los recuentos bacterianos mediante el desbridamiento subgingival. En determinados pacientes, como aquellos con determinados perfiles microbiológicos o aquellos con periodontitis agresiva, el uso de antimicrobianos como coadyuvantes al desbridamiento está justificado para minimizar las limitaciones del desbridamiento subgingival como monoterapia. El primer paso sería estudiar la respuesta *in vitro* de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* frente a distintos antimicrobianos en muestras de pacientes con periodontitis en Marruecos.

Objetivos

- Estudiar la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en España, así como la distribución de serotipos, la variación en la secuencia de los genes que codifican la leucotoxina y la distribución del operón de la toxina citolítica (*cdt*) en los pacientes con periodontitis en España.
- Comparar, dentro de una población marroquí, los perfiles microbiológicos de los pacientes positivos y negativos para *A. actinomycetemcomitans* y estudiar la distribución de serotipos y la virulencia de las cepas de *A. actinomycetemcomitans*, en

términos del operón del *cdt* y la variación en la secuencia de los genes que codifican la leucotoxina.

- Caracterizar la microbiota subgingival en una población marroquí con periodontitis agresiva, analizando la presencia y el recuento, mediante cultivo, de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Eikenella corrodens*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium* spp., y *Capnocytophaga* spp.
- Evaluar las susceptibilidades de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* frente a amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulánico, metronidazol y azitromicina mediante el test Epsilométrico (E-test®), y comparar, por otra parte, los perfiles microbiológicos de los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, o para ambos.

Material y métodos. Resultados

Artículo 1

Se analizaron las muestras de placa subgingival de 701 pacientes españoles con periodontitis. Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* se caracterizaron en términos de distribución de los serotipos y de los factores de virulencia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los resultados mostraron que la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* mediante cultivo fue 5.7%. La distribución de los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* fue muy variada. Ninguna cepa mostró la delección de 530 pares de bases en la región promotora de la leucotoxina que caracteriza la cepa JP2. El 65.8% de las cepas fueron Cdt positivas.

Artículo 2

Las muestras de placa de pacientes marroquíes con periodontitis fueron analizadas mediante cultivo para detectar la presencia de *A. actinomycetemcomitans* y en dichas muestras se utilizó la PCR para caracterizar dicha bacteria en términos de factores de virulencia (leucotoxina y Cdt) y distribución de los serotipos.

El 35.6% de los pacientes mostraron *A. actinomycetemcomitans*, su presencia se acompañó de bolsas periodontales más profundas y mayores proporciones de *P. micra*. Todas las cepas analizadas correspondían al serotipo “b” y el 78% fueron Cdt positivas. El 12.2% de los pacientes mostró el clon JP2.

Artículo 3

Se recogieron muestras de placa subgingival de 50 pacientes con periodontitis agresiva y 20 pacientes con periodontitis crónica en Marruecos y se analizaron mediante cultivo.

A. actinomycetemcomitans se halló más frecuentemente y en mayores proporciones en periodontitis agresiva generalizada que en periodontitis crónica. *P. gingivalis* se aisló con menor frecuencia en periodontitis agresiva localizada respecto a la periodontitis agresiva generalizada o crónica; la proporción de *P. gingivalis* fue mayor en los casos de periodontitis agresiva generalizada comparado con los casos de periodontitis agresiva localizada o crónica.

Artículo 4

Los perfiles de susceptibilidades frente a cuatro antibióticos distintos de las muestras de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* de pacientes marroquíes con periodontitis fueron analizadas mediante el test Epsilométrico (E-test®).

Sólo se detectó resistencia de *A. actinomycetemcomitans* frente a metronidazol y azitromicina.

Conclusiones

Los resultados de los cuatro artículos enfatizan la importancia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en la etiología de la periodontitis en dos países vecinos como España y Marruecos. La prevalencia y variabilidad genética de *A. actinomycetemcomitans* varía de manera relevante entre ambos países. En Marruecos, *P. gingivalis* es susceptible a la amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulánico, metronidazol y azitromicina mientras que *A. actinomycetemcomitans* solamente demostró resistencia frente a metronidazol y azitromicina.

Palabras clave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; serotipo; España; Marruecos; susceptibilidades a antimicrobianos

ABSTRACT

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* associated periodontitis: prevalence, genetic variability and therapeutic implications.**

Introduction

Periodontal diseases are a group of inflammatory diseases of bacterial etiology that affect the supporting tissues of the tooth. The prevalence of the two most frequent forms of periodontitis, chronic and aggressive, varies substantially between countries. Among all the bacterial species present in the oral cavity, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* have demonstrated, according to the criteria described by Socransky, a strong association with periodontitis. *A. actinomycetemcomitans*, particularly its highly virulent strain (clone JP2) has been shown to increase the risk of aggressive periodontitis in adolescents in the North African region. Therefore, it is reasonable to study the differences in the prevalence and genetic variability of this periodontal pathogen in two different populations, such as Spanish and Moroccan.

Objectives

- To study the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* in periodontitis patients in Spain, as well as the serotype distribution, the variation in the sequence of genes coding for leukotoxin and the distribution of cytolytic toxin (Cdt).
- To compare, within a Moroccan population, the microbiological profiles of positive and negative patients for *A. actinomycetemcomitans* and to study the serotype distribution and virulence of strains of *A. actinomycetemcomitans*, in terms of the *cdt* operon and variation in sequence of the genes encoding leukotoxin.
- To characterize the subgingival microbiota in a Moroccan population with aggressive periodontitis, by analyzing the presence and total counts of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Eikenella corrodens*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium* spp., y *Capnocytophaga* spp.

- To evaluate the susceptibilities of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* strains to amoxicillin, amoxicillin and clavulanic acid, metronidazole and azithromycin using the Epsilometric test (E-test®), and to compare the microbiological profiles of the patients positive for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, or both.

Material and methods. Results

Paper 1

Subgingival plaque samples from 701 Spanish patients with periodontitis were analyzed. Strains of *A. actinomycetemcomitans* were characterized in terms of serotype distribution and virulence factors by PCR. The results showed that the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* by culture was 5.7%. The distribution of the *A. actinomycetemcomitans* serotypes was very varied. No strain showed the deletion of 530 base pairs in the leukotoxin promoter region that characterizes strain JP2. 65.8% of the strains were Cdt positive.

Paper 2

Plaque samples from Moroccan patients with periodontitis were analyzed by culture to detect the presence of *A. actinomycetemcomitans* and PCR was used to characterize such bacteria in terms of virulence factors (leukotoxin and Cdt) and serotype distribution. 35.6% of the patients showed *A. actinomycetemcomitans*, its presence was accompanied by deeper periodontal pockets and higher proportions of *P. micra*. All strains analyzed corresponded to serotype "b" and 78% were Cdt positive. 12.2% of the patients showed clone JP2.

Paper 3

Subgingival plaques samples were collected from 50 patients with aggressive periodontitis and 20 patients with chronic periodontitis in Morocco and analyzed by culture. *A. actinomycetemcomitans* was found more frequently and in greater proportions in generalized aggressive periodontitis than in chronic periodontitis. *P. gingivalis* was less frequently isolated in localized aggressive periodontitis compared to

generalized or chronic aggressive periodontitis; the proportion of *P. gingivalis* was higher in cases of generalized aggressive periodontitis compared to cases of aggressive localized or chronic periodontitis.

Paper 4

The susceptibility profiles of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* samples from Moroccan patients with periodontitis to four different antibiotics were analyzed using the Epsilometric test (E-test®). Only resistance of *A. actinomycetemcomitans* against metronidazole and azithromycin was detected.

Conclusions

The results of the four papers emphasize the importance of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in the etiology of periodontitis in two neighboring countries such as Spain and Morocco. The prevalence and genetic variability of *A. actinomycetemcomitans* varies significantly between the two countries. In Morocco, *P. gingivalis* is susceptible to amoxicillin, amoxicillin and clavulanic acid, metronidazole and azithromycin whereas *A. actinomycetemcomitans* only showed resistance against metronidazole and azithromycin.

Key words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; serotype; Spain; Morocco; antimicrobials susceptibilities

III. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades periodontales: clasificación y prevalencia

Las enfermedades periodontales son un grupo de enfermedades inflamatorias causadas por bacterias organizadas en biofilms a nivel subgingival (Haffajee y Socransky, 1994). Los biofilms bacterianos son estructuras complejas de comunidades bacterianas adheridas a la superficie del diente (Marsh, 2005).

Estas enfermedades cursan con una afectación de las estructuras de soporte del diente: encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar. Esta afectación da lugar a una migración apical de la inserción epitelial y una reabsorción del hueso alveolar que puede desencadenar una pérdida de los dientes.

1.1. Clasificación de las enfermedades periodontales

La clasificación de las enfermedades periodontales presentada en *The International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* por la Academia Americana de Periodoncia en 1999 (Armitage, 1999) describe las siguientes categorías:

1. Enfermedades gingivales.
2. Periodontitis crónica.
3. Periodontitis agresiva.
4. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas.
5. Enfermedades periodontales necrosantes.
6. Abscesos periodontales.
7. Periodontitis asociadas a lesiones endodónticas.
8. Condiciones o deformidades adquiridas o del desarrollo.

Dependiendo del patrón de destrucción periodontal que presente el paciente, se define como periodontitis crónica o agresiva, siendo estas dos entidades las más frecuentes.

En función del grado de afectación, es decir, de su severidad, la periodontitis puede ser leve, moderada o avanzada. Se considera leve cuando la pérdida del nivel de inserción (considerado como la suma de la profundidad de sondaje y la recesión

gingival) es menor de 3 mm, moderada cuando este valor se encuentra entre 3 y 5 mm y avanzado cuando es mayor de 5 mm. Además de la severidad, tanto en la periodontitis crónica como agresiva, es importante estudiar su extensión, ya que puede ser localizada, cuando menos del 30% de las localizaciones presentan una determinada pérdida de inserción, o generalizada, cuando este valor supera el 30% de las localizaciones.

Dentro de la citada clasificación, se define la periodontitis crónica, anteriormente denominada periodontitis del adulto, como una forma de periodontitis lentamente progresiva asociada a determinados factores de riesgo, tales como la presencia de un depósito substancial de placa bacteriana y cálculo asociado a una inflamación gingival. Otros factores importantes son el hábito tabáquico, la genética y el estrés. El patrón microbiológico en la periodontitis crónica es variable e inespecífico (Haffajee et al., 2004).

La periodontitis agresiva, sin embargo, es una forma de periodontitis rápidamente progresiva, caracterizada por una destrucción significativa de la inserción periodontal a una edad temprana y con una clara tendencia a la agregación familiar de casos (Tonetti y Mombelli, 1999). Se observa en sujetos sistémicamente sanos en los que la avanzada afectación periodontal no se corresponde con la cantidad de factor etiológico presente, es decir, el sujeto puede no presentar una gran cantidad de placa bacteriana o de inflamación gingival pero sin embargo muestra una evidente afectación de los tejidos de soporte del diente (Armitage y Cullinan, 2010).

1.2. Prevalencia de las enfermedades periodontales

Diversos estudios epidemiológicos han estimado la prevalencia de las enfermedades periodontales, sin embargo, en determinadas publicaciones, no se hace referencia al tipo de periodontitis.

De este modo, los datos divulgados por la Encuesta de Salud Oral realizada en España en 2012, reflejan que, en el caso de los adultos jóvenes (pacientes de entre 35 y 44 años), la prevalencia de la periodontitis es del 84%, presentando éstos más frecuentemente bolsas periodontales poco profundas (11%) que profundas (5%). En el

caso de la cohorte de pacientes de 65-74 años, la prevalencia de la periodontitis es de 94.2% y la distribución de las bolsas periodontales es semejante, siendo más común encontrar bolsas periodontales poco profundas (18.8%) que profundas (10.4%). Tanto la pérdida de inserción moderada (4-5 mm) como la avanzada (más de 6 mm) es más común en la cohorte etaria de 65 a 74 años (26.8% y 17.7%, respectivamente) que en el grupo de adultos jóvenes (19.7% y 6%, respectivamente) (Llodrá, 2012).

Por otra parte, la prevalencia de la periodontitis en Estados Unidos es del 46% para pacientes mayores de 30 años, lo que supone una cifra de 64.7 millones de personas, de las cuales un 8.9% padece periodontitis avanzada. La prevalencia de la periodontitis es mayor en hombres y aumenta a la vez que la cohorte de edad es más avanzada, asimismo, es mayor en hispanos (63.5%) que en los pacientes de raza negra no hispana (59.1%), seguida de los asiáticos-americanos de raza no hispana (50%) y ligeramente inferior para los pacientes de raza blanca no hispana (40.8%) (Eke et al., 2015)

Haciendo distinción según el tipo de periodontitis, la periodontitis crónica es la entidad más común, con una prevalencia de entre 13% y 57% a nivel mundial, sin diferencias significativas entre distintos grupos étnicos (Van der Velden et al., 2006).

Sin embargo, la prevalencia de la periodontitis agresiva varía entre distintos grupos étnicos, con un valor de menos del 1% en los caucásicos y más del doble, 2.6%, en algunos grupos de poblaciones africanas (Brown et al., 1996); esto se hace relevante en algunas regiones que se ven especialmente afectadas por este tipo de periodontitis, como ocurre en Marruecos, donde la prevalencia de periodontitis agresiva alcanza valores de 7.6% (Haubek et al., 2001).

2. Importancia de las enfermedades periodontales y efectos a nivel local y sistémico

Las enfermedades periodontales son infecciones bacterianas que provocan la destrucción de los tejidos de soporte del diente, lo cual desencadena un aumento en la movilidad de los dientes y una ulterior pérdida de los mismos. Esta condición va a desencadenar consecuencias a nivel local y sistémico.

2.1. Efectos de la periodontitis a nivel local

A nivel local, la inflamación y la pérdida de soporte de los tejidos periodontales, asociada a periodontitis, cursa con sangrado gingival, halitosis (De Geest et al., 2016), retención de alimentos entre los dientes y alteraciones de los márgenes gingivales, como son las recesiones gingivales; esta consecuencia antiestética produce hipersensibilidad dentinaria, condición que es muy molesta para la vida cotidiana de los pacientes (von Troil et al., 2002).

La pérdida dentaria, como resultado de la periodontitis no tratada, ocasiona una falta de estabilidad oclusal que causa una migración dental patológica y dificulta tanto la masticación y la alimentación del paciente como la posterior rehabilitación de la función y estética de su boca, afectando así a la calidad de vida del paciente (Ferreira et al., 2017).

2.2. Efectos de la periodontitis a nivel sistémico

En los últimos años, la investigación en Periodoncia ha centrado sus esfuerzos en el estudio de la relación de las enfermedades periodontales con otras enfermedades sistémicas.

La relación entre la periodontitis y determinadas enfermedades sistémicas se manifiesta por el paso de las bacterias presentes en las bolsas periodontales, a través del epitelio de unión ulcerado, hacia el torrente sanguíneo; dicho fenómeno, conocido como bacteriemia, produce un daño tisular directo en los tejidos que invaden dichas bacterias. Existen, además, otros mecanismos de interacción indirectos que pueden explicar dicha relación, como son la respuesta inflamatoria mediada por mediadores proinflamatorios (citoquinas) en los tejidos distantes a la cavidad oral o la respuesta inmune mediada por la producción de anticuerpos contra los antígenos bacterianos (Borgnakke, 2015).

La asociación se ha descrito como fuerte entre la periodontitis y las enfermedades cardiovasculares o la diabetes mellitus tipo 2. En el caso de la diabetes la relación es bidireccional, ya que la diabetes aumenta el riesgo de inicio y progresión de la periodontitis (Mealey y Oates, 2006), y de la misma manera, el paciente con periodontitis no tratada tiene más riesgo de sufrir diabetes y puede verse afectada

también la progresión de este conjunto de desórdenes metabólicos (Taylor et al., 1996). Se ha demostrado que el tratamiento de la periodontitis puede mejorar el control de la glucemia (Janket et al., 2005) y que existe mayor recurrencia de las enfermedades periodontales en diabéticos mal controlados (Llambes et al., 2015).

La asociación de la periodontitis es moderada con resultados adversos del embarazo y con la artritis reumatoide, así como con las enfermedades respiratorias (Thomas et al., 2015).

3. Etiología de las enfermedades periodontales

La etiología de las enfermedades periodontales tiene un carácter multifactorial, es decir, están causadas por bacterias periodontopatógenas organizadas en un biofilm subgingival que actúan como factor etiológico primario. Sobre éste, influye la presencia de un huésped más o menos susceptible y unos factores predisponentes locales y/o factores modificadores sistémicos que determinan la edad de aparición de la enfermedad, la tasa de progresión y la severidad de la periodontitis (Genco y Borgnakke, 2013; AlJehani, 2014).

Los factores predisponentes se definen como aquellos factores (generalmente locales) que dificultan la eliminación del biofilm subgingival, como por ejemplo, el cálculo supragingival y subgingival, la malposición dentaria, y determinados factores iatrogénicos como las obturaciones desbordantes y las prótesis mal ajustadas (Knight et al., 2016). Por otra parte, los factores modificadores pueden alterar la naturaleza o el curso de la enfermedad y son mayoritariamente sistémicos. A continuación se desarrollan el consumo de tabaco y la diabetes como factores de riesgo, y el estrés, los cambios hormonales y el síndrome metabólico como indicadores de riesgo o factores de riesgo putativos.

El **tabaco** es un factor de riesgo para la aparición y progresión de la periodontitis (Norderyd et al., 1999), ya que se ha demostrado su relación con la pérdida del hueso alveolar (Jansson y Lavstedt, 2002), el desarrollo de las bolsas periodontales (van der

Weijden et al., 2001) y la pérdida dentaria (Ragnarsson et al., 1992). Parece que el tabaco multiplica el riesgo de sufrir periodontitis avanzada (Papapanou, 1996), independientemente de la higiene oral del paciente (Knight et al., 2016).

La **diabetes no controlada** es un factor de riesgo para el desarrollo de la periodontitis (Lim et al., 2007). En un estudio epidemiológico (*National Health and Nutrition Examination Survey III*) se relacionó un inadecuado control de la glucemia con una mayor prevalencia y severidad de las enfermedades periodontales; así, los adultos diabéticos mayores de 45 años, tenían 3 veces más probabilidad de sufrir periodontitis frente a aquellos no diabéticos (Tsai et al., 2002).

El **estrés** (medido en escalas de ansiedad por el propio paciente) ha sido asociado a la progresión de la periodontitis, reflejado en un aumento en las profundidades de sondaje y pérdida de inserción de los tejidos periodontales (Peruzzo et al., 2007). Además, el estrés supone unos cambios en la conducta del paciente que explican el efecto de esta reacción del organismo sobre la periodontitis; el abandono de los cuidados dentales, una mala higiene oral, el descuido en los hábitos alimenticios, o el aumento del hábito tabáquico son algunos ejemplos.

Los **cambios hormonales** que ocurren en las mujeres durante la pubertad, el embarazo y la menopausia pueden tener un efecto sobre los tejidos periodontales. La inflamación gingival (medida mediante los índices gingivales) es significativamente mayor durante el embarazo (principalmente durante el segundo o tercer trimestre) comparado con mujeres no embarazadas o aquellas que ya han dado a luz (Figuero et al., 2013).

El **síndrome metabólico** se trata de la confluencia de la obesidad abdominal junto con dos de las siguientes situaciones en un mismo paciente: hipertensión, hiperglucemia, o tasas elevadas de triglicéridos y tasas reducidas de colesterol lipoproteína de alta densidad (HDL) (Alberti et al., 2005). El síndrome metabólico es un indicador de riesgo de periodontitis. En un estudio realizado en 9000 pacientes japoneses no fumadores, se observó que la confluencia de tres o más componentes del síndrome metabólico

estaba significativamente asociado con una mayor prevalencia de periodontitis comparado con aquellos pacientes que presentaban solamente uno o dos componentes (Hasegawa, 2004). La evidencia es preliminar y se necesitan estudios intervencionistas para categorizar el síndrome metabólico como un factor de riesgo de periodontitis (Knight et al., 2016).

4. Patógenos periodontales

4.1. Organización de las bacterias en el biofilm subgingival

La periodontitis es considerada como una infección mixta causada, básicamente, por bacterias Gram-negativas anaerobias que viven formando biofilms próximos a la superficie dental y por debajo del margen gingival; dicha estructura le confiere algunas propiedades, como son la protección y la resistencia frente a los factores ambientales o determinadas sustancias tóxicas (Costerton et al., 1999), lo que supone una susceptibilidad reducida frente a determinados antibióticos (Marsh, 2005).

4.2. Papel de las bacterias en la etiología de las enfermedades periodontales

El estudio del papel de las bacterias en la etiología de la periodontitis se postuló inicialmente como la hipótesis de “placa inespecífica” (Theilade, 1986), en la que la cantidad de placa era el factor etiológico principal. Más tarde, debido a la observación de que la destrucción tisular afectaba de distinta manera a los sujetos, o incluso a distintas localizaciones en la cavidad oral de un mismo paciente se promulgó la hipótesis de “placa específica” (Loesche, 1979), en la que la presencia de determinadas especies bacterianas en cantidades o proporciones elevadas, organizadas en un biofilm subgingival, justificaban la aparición y la progresión de las enfermedades periodontales.

4.3. Identificación de patógenos periodontales

Actualmente, existe evidencia suficiente para considerar que, de las aproximadamente 700 especies bacterianas que habitan en la cavidad oral, sólo un número limitado de

ellas muestran el potencial patogénico compatible con el daño causado en la cavidad oral por las enfermedades periodontales (Haffajee y Socransky, 1994).

Se han propuesto seis criterios que una especie bacteriana debería cumplir para determinar que es periodonto-patógena (Haffajee y Socransky, 1994), son los siguientes:

1. Criterio de asociación: la bacteria debe encontrarse más frecuentemente y en mayor número en casos de infección que en sujetos sin infección o con formas distintas de enfermedad.
2. Criterio de eliminación: la eliminación de la bacteria debe acompañarse de la remisión paralela de la enfermedad.
3. Criterio de respuesta del huésped: si la bacteria, o su antígeno, alcanza los tejidos periodontales y causa daño, parece claro que el huésped producirá anticuerpos o activará la respuesta inmune celular de manera específica contra esa bacteria.
4. Criterio de factores de virulencia: la bacteria produce determinantes bioquímicos que son potencialmente dañinos, de manera directa o indirecta sobre los tejidos del huésped; esto sugiere la participación de la bacteria en el proceso patológico.
5. Criterio de modelos animales: la bacteria se inocula en el animal para inducir la enfermedad, y esto sugiere que dicha bacteria puede tener un papel directo en la progresión de la enfermedad.
6. Criterio de los factores de riesgo: mediante el estudio de microorganismos específicos en muestras de placa subgingival, se identifica una determinada especie bacteriana en un momento concreto y se determina el riesgo de progresión de la enfermedad asociada a la presencia de concentraciones determinadas de dicha especie.

De acuerdo al cumplimiento de estos criterios, en el *Workshop* Mundial de Periodoncia celebrado en 1996 (Jeffcoat, 1996) se determinó que existen tres especies bacterianas con una evidencia de asociación fuerte con las periodontitis. Estas especies son

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*.

Prevotella intermedia, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola* y otras especies de espiroquetas, demuestran una asociación moderada.

Eikenella corrodens, *Pseudomonas* spp., *Selenomonas* spp., *Staphylococcus* spp., bacilos entéricos y los hongos pertenecen a la categoría de asociación inicial.

El peso de la evidencia científica en relación a los criterios postulados por Haffajee y Socransky en 1994 (Haffajee y Socransky, 1994) era notable para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, lo cual les otorgaba el papel de agentes etiológicos de las enfermedades periodontales. A continuación se desarrollan dichos criterios para ambas especies.

5. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans ha sido descrito como uno de los factores principales en la etiología de las periodontitis refractarias y de comienzo temprano, nomenclatura que hace referencia a las hoy consideradas periodontitis agresivas (Slots, 1999).

Dicha bacteria es un coco- bacilo, con bordes redondeados, pequeño, no mótil, Gram – y no esporulado. Como características bioquímicas, cabe resaltar que es sacarolítico, catalasa positivo, capnofílico y anaerobio facultativo. Forman pequeñas colonias (de aproximadamente 1 mm de diámetro tras 2-3 días de incubación) y son convexas, circulares, translúcidas y con contornos irregulares y una configuración interna descrita como estrellada.

Actualmente se distinguen 6 serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (“a”-“f”) en función del tipo de polisacárido que conforma el antígeno inmunodominante de la membrana, el lipopolisacárido (Kaplan et al., 2001); es importante remarcar que no

hay evidencia de que el antígeno del serotipo *per se* sea un determinante claro de virulencia de la bacteria (Rylev y Kilian, 2008).

Un único serotipo tiende a colonizar un individuo, aunque no es raro encontrar niveles elevados de respuesta de anticuerpos en suero a distintos serotipos en una misma muestra. Esto se hizo especialmente evidente en una población japonesa, en la que un 33% de localizaciones en las que la bacteria estaba presente mostraban la colonización por dos o tres serotipos distintos (Yoshida et al., 2003); en este artículo se encontró una asociación entre determinados serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y la presencia de otros miembros de la microbiota. La frecuencia del serotipo “c” era mayor en localizaciones con presencia de *P. gingivalis* que en casos de ausencia de dicha bacteria.

5.1. Criterios de determinación del periodonto-patógeno

5.1.1. Criterio de asociación

A. actinomycetemcomitans se ha detectado en lesiones de gingivitis (Gafan et al., 2004), y en lesiones de periodontitis crónica (Wang et al., 2005) y agresiva (Slots et al., 1990).

Además, se han encontrado niveles de prevalencia y recuentos de *A. actinomycetemcomitans* estadísticamente superiores en pacientes diagnosticados de periodontitis crónica o agresiva comparado con pacientes con gingivitis o pacientes con salud periodontal, mediante la técnica de DNA-DNA *checkerboard hybridization* (hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez) en una muestra de 402 pacientes brasileños (da Silva-Boghossian et al., 2011).

Elamin y cols. en el año 2011, hallaron, en una población sudanesa cuyos perfiles microbiológicos fueron estudiados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* significativamente superior en pacientes con periodontitis agresiva que en los pacientes sin afectación periodontal (70.6% y 5.9%, respectivamente) (Elamin et al., 2011).

5.1.2. Criterio de eliminación

La eliminación o supresión de este patógeno se acompaña de una mejoría clínica de la enfermedad; así, en el artículo de Pavicic y cols. se demostró que la eliminación de *A. actinomycetemcomitans* tras el desbridamiento del biofilm subgingival junto con la administración de amoxicilina y metronidazol provocaba una mejoría de la condición periodontal del paciente (Pavičič et al., 1994). Asimismo, la persistencia de *A. actinomycetemcomitans* tras el tratamiento periodontal se correspondía con formas recidivantes de periodontitis (Renvert et al., 1990).

5.1.3. Criterio de respuesta del huésped

A. actinomycetemcomitans tiene la capacidad de invadir células epiteliales *in vitro* (Meyer et al., 1997) y de secretar proteínas y componentes de la pared bacteriana que inducen la división celular de los linfocitos B, lo que explica la presencia de altos niveles de inmunoglobulina-G en el suero de pacientes con periodontitis agresiva localizada (Lamster et al., 1998). Además, se han encontrado también niveles elevados de anticuerpos frente a *A. actinomycetemcomitans* en la saliva y suero de pacientes con periodontitis crónica (Taubman et al., 1992).

5.1.4. Criterio de factores de virulencia

A. actinomycetemcomitans muestra una enorme diversidad de factores de virulencia que le confieren su importante capacidad patogénica. A continuación se detalla la organización de estos factores en tres grupos; aquellos que facilitan la colonización, los que posibilitan la multiplicación y competición con otras bacterias y los que provocan la evasión de la respuesta inmune del huésped.

a) Factores que facilitan la colonización:

La colonización mediante la adhesión es un requisito para que se desarrolle el proceso de infección. Entre los factores que intervienen en este proceso se encuentran las fimbrias, que son pequeños apéndices filamentosos localizados sobre la superficie celular. Esta especie bacteriana se sirve además de otras proteínas de membrana externa (proteínas EmaA y Aae) y otros componentes asociados a dicha membrana,

como son los pili PilA, ayudados por polisacáridos extracelulares que juegan un papel también fundamental en el proceso de colonización (Fine et al., 2006).

A. actinomycetemcomitans tiene, además, capacidad de adhesión mediante adhesinas a la hidroxiapatita, a la saliva y a las células epiteliales humanas, con cierto tropismo descrito según el tejido (Fine et al., 2006).

b) Multiplicación y competición con otras bacterias:

Mediante la colonización, *A. actinomycetemcomitans* tiene la capacidad de invadir las células humanas no fagocíticas. Además, se ha descrito su capacidad de autoagregación, de coagregación con *F. nucleatum* (Rosen et al., 2003) y *P. gingivalis* (Suzuki et al., 2006), y de formar el biofilm subgingival, compitiendo con otras especies bacterianas a través de bacteriocinas, que son proteínas secretadas al medio externo y que resultan letales para otras cepas o especies bacterianas. *A. actinomycetemcomitans* es responsable de la producción de actinobacilina, una bacterioquina activa contra *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus uberis* y *Actinomyces viscosus* (Stevens et al., 1987).

c) Evasión de la respuesta inmune del huésped:

Con el fin de evadir la respuesta inmune del huésped durante el proceso de colonización y así contribuir a la patogénesis de la infección periodontal, *A. actinomycetemcomitans* segrega dos toxinas, la leucotoxina y la toxina de dilatación citoletal (Cdt) (Fine et al., 2006).

La **leucotoxina** es un producto de una proteasa, termolábil, perteneciente a la familia de las toxinas *Repeat in Toxin*, que tiene la capacidad de producir la lisis de los leucocitos polimorfonucleares (Baehni et al., 1981), de los monocitos humanos (Taichman et al., 1980) y de la línea celular de los neutrófilos (Zambon et al., 1983) produciendo perturbaciones en la membrana de las células y evadiendo una parte importante de sistema inmune innato del hospedador. Dicha leucotoxina está codificada por un operón de un gen compuesto por cuatro genes, *ltxA*, *ltxB*, *ltxC* y *ltxD*. El gen *ltxA* es el estructural (Lally et al., 1989), los genes *ltx B* y *D* codifican las proteínas

encargadas del transporte del gen *ltxA* a la superficie celular, mientras que *ltxC* se encarga de la activación post-transcripcional de la toxina.

Existe una delección de 530 pares de bases en la región promotora del gen operón de la leucotoxina en determinadas cepas que muestran niveles de actividad de la leucotoxina incrementada de diez a veinte veces (Brogan et al., 1994). Estas cepas altamente virulentas reciben el nombre de clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans* y tienen características similares a las propias de un patógeno exógeno (Haubek, 2010).

Los aislados caracterizados con la cepa altamente leucotóxica de *A. actinomycetemcomitans* pertenecen exclusivamente a sujetos o familias con historia de periodontitis agresiva (Haubek et al., 1997; Haubek et al., 1996; Bueno et al., 1998; Mombelli et al., 1999; Haraszthy et al., 2000). Además, se ha demostrado, con un estudio longitudinal, en un grupo de 700 adolescentes marroquíes, que la cepa JP2 puede considerarse un agente etiológico de la periodontitis agresiva en pacientes con residencia o que provienen de la región norte-oeste de África (Haubek et al., 2008). Este clon, a pesar de ser endémico en el norte de África, ha sido aislado en inmigrantes africanos en países europeos (Haubek et al., 1997).

La infección con el clon JP2 no es solamente un factor de riesgo de periodontitis de comienzo temprano, sino que los pacientes infectados con dicho clon presentan estadios más avanzados de enfermedad que los pacientes libres de este clon (Haubek et al., 2001).

Por otra parte, la expresión de la leucotoxina en las cepas mínimamente leucotóxicas, denominadas cepas 652 de *A. actinomycetemcomitans*, está dirigida por un solo promotor que no se corresponde con ninguno de los dos promotores que actúan en la expresión de la leucotoxina en las cepas JP2 y carece de la delección de 530 pares de bases, lo cual resulta en una asociación con una severidad menor de las enfermedades periodontales.

A. actinomycetemcomitans produce otro factor de virulencia, conocido como **operón de la toxina de dilatación citoletal (Cdt)**, que codifica una toxina que suprime el ciclo

celular en la fase G2, por lo que inhibe la proliferación celular e induce la muerte celular (Lara-Tejero y Galan, 2001).

Los genes del *cdt*, “a”, “b” y “c” están presentes en un 80% de las cepas de *A. actinomycetemcomitans*, aunque la asociación con la enfermedad no ha sido aún determinada (Fine et al., 2006). Se necesitan más estudios para dilucidar si existen diferencias entre cepas que colonizan distintas poblaciones étnicas.

5.1.5. Criterio de modelos animales

Como se ha dicho anteriormente, las bacterias en el biofilm subgingival están rodeadas de una matriz extracelular que les mantiene unidas entre ellas y a la superficie subyacente (Costerton et al., 1999); esta sustancia extracelular supone una fuente, entre otras sustancias, de exopolisacáridos. El exopolisacárido de superficie de *A. actinomycetemcomitans* se trata de una estructura que le protege del ataque de péptidos antimicrobianos o de la eliminación por parte de los fagocitos (Venketaraman et al., 2008). En un estudio experimental se alimentaron ratas con dos cepas de *A. actinomycetemcomitans* distintas; una de ellas había sido modificada genéticamente para privar a la especie bacteriana del exopolisacárido de superficie y la otra se trataba de una cepa de *A. actinomycetemcomitans* salvaje. En ambos casos se demostró la colonización de la bacteria, la activación de la respuesta inmune mediante la producción de anticuerpos, y se evidenció la afectación periodontal en las ratas, la cual, fue significativamente menor en el grupo que presentaba la cepa de *A. actinomycetemcomitans* privada del exopolisacárido (Shanmugam et al., 2015).

5.1.6. Criterio de análisis de riesgo

Un estudio retrospectivo analizó la progresión de la periodontitis y los cambios en la microbiota subgingival en una población indonesia privada de atención dental; las variables clínicas y microbiológicas de los pacientes incluidos en este estudio fueron evaluadas inicialmente, en el año 1987, y 7 años después, en 1994. La presencia de placa representaba el factor más importante respecto a la progresión de la periodontitis; además, se apuntó la relación entre la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en la microbiota subgingival y la probabilidad aumentada de

progresión de la periodontitis (odds ratio, OR 2.9) (Timmerman et al., 2001). Los cambios en las variables clínicas y microbiológicas en este grupo de jóvenes indonesios se analizaron quince años tras la evaluación inicial, en el año 2002 y fueron publicados en un estudio prospectivo (Van der Velden et al., 2006), en el cual se identificó la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en la microbiota subgingival como un factor de riesgo para la aparición de la periodontitis, con un OR de 4.3.

Se ha demostrado que determinadas cepas de *A. actinomycetemcomitans* suponen mayor riesgo que otras. Haubek y cols. en el año 2008, estudiaron, en términos de variables clínicas y microbiológicas, una muestra de 682 adolescentes marroquíes libres de afectación periodontal. Dos años más tarde, se comprobó la progresión de la periodontitis en relación al patrón microbiológico que presentaban dichos pacientes; la presencia del clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans* en la microbiota de los pacientes vaticinaba un riesgo aumentado de sufrir pérdida de inserción, con un riesgo relativo de 18; sin embargo, aquellos sujetos que presentaban, entre sus recuentos bacterianos, varias cepas genéticamente distintas de *A. actinomycetemcomitans* (el clon JP2 y la cepa mínimamente leucotóxica) presentaban un riesgo relativo menor (12.4) de sufrir pérdida de inserción (Haubek et al., 2008).

5.2. Distribución geográfica de *A. actinomycetemcomitans*

La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* varía según la etnia del paciente, la afectación periodontal que el paciente presente y el método utilizado para su detección (Rylev y Kilian, 2008). Conforme a esto, a continuación se detalla la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en las entidades clínicas más comunes de las enfermedades periodontales, la periodontitis crónica y la periodontitis agresiva según la metodología empleada para su detección.

En el caso de periodontitis crónica, la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en España utilizando el cultivo como método de detección varía entre 6.3% y 3.2% en dos muestras de pacientes cuya media de edad era de 49.4 y 43 años, respectivamente (Sanz et al., 2000; Lau et al., 2004); en el artículo de Sanz se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* entre Holanda (23.3%) y España (3.2%) para dos grupos de pacientes con características demográficas y clínicas

muy similares (Sanz et al., 2000). Utilizando la misma metodología, un estudio retrospectivo encontró presencia de este periodonto-patógeno en un 40% de los casos, en un grupo de adolescentes indonesios con edades comprendidas entre 22 y 32 años (Timmerman et al., 2001).

La PCR ocupa un lugar importante en las técnicas moleculares empleadas para el procesamiento de muestras de placa subgingival (Sanz et al., 2004). Utilizando esta metodología, se ha determinado un 41.6% de prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en adultos con periodontitis crónica (media de edad de 40 años), en Brasil (Cortelli et al., 2005) y 19.5% en Japón (Yoshida et al., 2003).

En el caso de la periodontitis agresiva, parece que la frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* es más elevada que en la periodontitis crónica. Así, Mombelli y cols. en el año 1998, mediante cultivo, detectaron la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en el 62% de los pacientes con edades comprendidas entre 17 y 39 años en China (Mombelli et al., 1998). En pacientes brasileños, y utilizando PCR, la frecuencia de detección de esta bacteria fue de 72% (Cortelli et al., 2005). El 54.4% de los pacientes con periodontitis agresiva en Ghana presentaban esta especie bacteriana entre sus recuentos (Aberg et al., 2012) y el 70.3% en Sudán (Elamin et al., 2011).

En relación con la etnia del paciente, parece que la detección de *A. actinomycetemcomitans* es más frecuente en hispanicos y asiáticos residentes en Estados Unidos en comparación con los pacientes de raza caucásica (Umeda et al., 1998). Además, en determinadas poblaciones como los adolescentes en Marruecos (árabes y bereberes) y en adultos de varios grupos de poblaciones asiáticas, se aísla *A. actinomycetemcomitans* de manera frecuente, independientemente de la tasa de actividad de la periodontitis (Rylev y Kilian, 2008). De esta manera, la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en Marruecos es de 13% en el caso de los pacientes con periodontitis crónica severa y 37.5% en el caso de aquellos que presentan una periodontitis agresiva (Benrachadi et al., 2012).

Las evidentes diferencias en la prevalencia de este periodonto-patógeno pueden explicarse principalmente por los distintos métodos de detección utilizados, las diferencias entre etnias y las características de la población estudiada; sin embargo

todos los artículos coinciden en que la presencia de *A. actinomycetemcomitans* está relacionada con la aparición y progresión de las enfermedades periodontales, principalmente en los casos de periodontitis agresiva.

6. *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis juega un papel destacado en la progresión de las enfermedades periodontales y es considerado, una especie bacteriana con una evidencia de asociación fuerte con las enfermedades periodontales (Jeffcoat, 1996).

Dicha bacteria es un bacilo Gram -, inmóvil, cuya morfología varía entre cocoide y bacilar corta. Como características bioquímicas cabe resaltar que es asacarolítico, anaerobio estricto y forma colonias convexas de 1-2 mm de diámetro de color pardo a negro en agar sangre tras dos semanas desde su incubación. Pertenece al género *Bacteroidetes*.

6.1. Criterios de determinación del periodonto-patógeno

6.1.1. Criterio de asociación

La frecuencia de detección mediante cultivo de *P. gingivalis* es el doble en muestras de pacientes con gingivitis que la hallada en muestras de pacientes que muestran salud periodontal (40% y 20%, respectivamente) y es más frecuente y más abundante en las muestras de periodontitis (80%) (Lau et al., 2004). Tomita y cols. en el año 2013, hallaron la presencia de esta bacteria en muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica (75%) y agresiva (60%) y no así en pacientes sin afectación periodontal. Además, se ha demostrado una relación positiva con la profundidad de la bolsa periodontal (Socransky y Haffajee, 2005). Es más importante la carga bacteriana que la mera presencia del patógeno (Borrell y Papapanou, 2005).

6.1.2. Criterio de eliminación

Tras el tratamiento periodontal básico (raspado y alisado radicular), se produjo una reducción en las profundidades de sondaje que se acompañó de una reducción

significativa de los recuentos totales de *P. gingivalis* y el porcentaje de localizaciones en las que se aislaba la bacteria (Kawada et al., 2004).

La concentración de *P. gingivalis* se reduce en los sitios con la periodontitis controlada pero su presencia es más común en localizaciones con recidiva de la enfermedad o persistencia de bolsas periodontales profundas tras el tratamiento (Colombo et al., 2012).

6.1.3. Criterio de respuesta del huésped

P. gingivalis invade los tejidos periodontales e inicia o contribuye al proceso patológico de la periodontitis (Haffajee et al., 2004), mediante la inducción de la respuesta inmune local y sistémica observada en pacientes con distintas formas de periodontitis (Mahanonda et al., 1991).

En caso de una invasión bacteriana, los neutrófilos son una de las primeras líneas celulares en migrar al lugar donde se desarrolla la inflamación. Un estudio realizado por un grupo de investigación chileno (Restaino et al., 2007) comparó los neutrófilos aislados en lesiones de pacientes con periodontitis crónica y en pacientes sanos, y todos ellos fueron estimulados con cepas de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*; se observó una mayor reactividad de los neutrófilos en los pacientes con periodontitis crónica frente a los controles sanos, la cual se asoció a las reacciones inflamatorias que tienen lugar en los tejidos periodontales como consecuencia de la invasión bacteriana. Por otro lado, un estudio reconoció que el 5% de las células plasmáticas presentes en las lesiones de periodontitis crónica avanzada producían anticuerpos como respuesta a la invasión de *P. gingivalis* sobre las células del huésped (Ogawa et al., 1989).

6.1.4. Criterio de factores de virulencia

a) Factores que facilitan la colonización:

Las fimbrias son el principal determinante adhesivo sobre la superficie celular; *P. gingivalis* expresa dos tipos de fimbrias, mayores y menores. Las fimbrias mayores son capaces de adherirse a células epiteliales, células endoteliales y monocitos y pueden invadir las células del huésped. Los genes de las fimbrias mayores de *P. gingivalis* (fim

A) se clasifican en 6 variantes (I-V y Ib), siendo las variantes Ib, II y IV de fim A las que se encuentran más estrechamente ligadas a la progresión de la periodontitis (Fabrizi et al., 2013).

b) Multiplicación y competición con otras bacterias:

El crecimiento de *P. gingivalis* se ve favorecido por diversas proteinasas y proteínas de la membrana externa y hemolisinas que le proporcionan nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo (Holt y Ebersole, 2005).

c) Evasión de la respuesta del huésped:

P. gingivalis utiliza la cápsula y los lipopolisacáridos que paralizan la respuesta inmune mediada por anticuerpos y mediante las proteasas, especialmente las gingipainas que representan el 85% de la actividad preteolítica de *P. gingivalis* (Holt y Ebersole, 2005).

6.1.5. Criterio de modelos animales

Baker y cols. en el año 1994, compararon ratones inmunocompetentes e inmunodeprimidos que fueron infectados con *P. gingivalis* mediante alimentación con sonda. Los dos grupos comparados mostraron anticuerpos específicos contra *P. gingivalis* y en ambos se produjo pérdida ósea, incluso en los ratones inmunodeprimidos (privados de linfocitos B y T) y en los cuales se esperaba encontrar una reabsorción menor del hueso alveolar (Baker et al., 1994). Cinco años después, el mismo grupo de investigación corroboró que la infección de ratones con cepas de *P. gingivalis* inducía la reabsorción del hueso alveolar; en este artículo se observó que la pérdida ósea iba precedida por la producción de anticuerpos específicos contra *P. gingivalis*, cuyos niveles se mantenían elevados a medida que la pérdida de hueso aumentaba. Concluyeron que la presencia de dichos anticuerpos no prevenía la pérdida ósea (Baker et al., 1999).

6.1.6. Criterio de análisis de riesgo

En un estudio llevado a cabo en 1994 en 492 pacientes se evaluó la incidencia de pérdida de inserción en un periodo de 18 meses de acuerdo a las variables microbiológicas; aquellos pacientes en los que *P. gingivalis* representaba más del 2%

de la microbiota total en el momento inicial mostraron un riesgo cinco veces mayor de padecer pérdida de inserción (Brown et al., 1994).

Por otra parte, se evaluó una población de adultos chinos privada de cuidados dentales en un estudio longitudinal cuyo objetivo, entre otros, era relacionar las variables microbiológicas con la progresión de la periodontitis en un periodo de 10 años. La presencia de *P. gingivalis*, entre otros periodonto-patógenos, se estudió mediante la técnica de hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez y se estableció en 5 niveles, de 0 a 5. Cuanto mayor era el nivel de detección de *P. gingivalis*, mayor era también la probabilidad de presentar progresión de la periodontitis, que se reflejaba bien mediante el número de localizaciones con profundidades de sondaje mayores o iguales a 5 mm o bien, con pérdida de inserción mayor o igual a 3 mm a los 10 años (Papapanou et al., 1997).

6.2. Distribución geográfica de *P. gingivalis*

La prevalencia de este periodonto-patógeno varía en función de las localizaciones geográficas.

En Europa, un estudio realizado por Sanz y cols. en el año 2000 mediante cultivo detectó prevalencias distintas de *P. gingivalis* en España (64.5%) y en Holanda (36.7%) (Sanz et al., 2000). Unos años después, se halló una buena correlación entre los valores de prevalencia de *P. gingivalis* obtenidos mediante cultivo (84.4%) y PCR (81.3%) en pacientes españoles con periodontitis (Lau et al., 2004).

Una investigación reciente que analizó la prevalencia de *P. gingivalis* en Marruecos no encontró diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con periodontitis crónica y agresiva severa, con unos valores de 53.3% y 37.5%, respectivamente (Benrachadi et al., 2012).

La prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis crónica en Sudamérica varía, una vez más, según la metodología utilizada. En Brasil, casi un tercio de la población analizada mostró un resultado positivo mediante PCR para esta bacteria (Cortelli et al., 2005); sin embargo, cuando la técnica empleada fue la hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez apenas un 7.5% de los pacientes presentaban esta

bacteria (Haffajee et al., 2004); en este mismo estudio se observó una gran variabilidad en la microbiota subgingival de pacientes con periodontitis en Brasil, Chile, Estados Unidos y Suecia, países en los que la prevalencia de *P. gingivalis* era de 7.5%, 11.9%, 6.6% y 1.6%, respectivamente.

En Asia, en poblaciones como la indonesia, se determinó, también mediante cultivo, que la prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis crónica era de 67% (Timmerman et al., 2001); valores similares describieron Tomita y cols. en el año 2013 en Japón utilizando la PCR, haciendo distinción entre el grupo de periodontitis crónica, en el que la prevalencia fue de 75% y en el grupo de pacientes con periodontitis agresiva, cuyo valor fue de 60% (Tomita et al., 2013).

7. Tratamiento de las enfermedades periodontales

El tratamiento de la periodontitis incluye una primera fase de control de los factores sistémicos tales como el hábito tabáquico o la estabilización de determinadas condiciones sistémicas que presenta el paciente. Es de vital importancia la motivación del paciente y la instrucción en las distintas técnicas de higiene oral.

7.1. Tratamiento periodontal causal

El tratamiento causal de la periodontitis consiste fundamentalmente en el raspado y alisado radicular, que persigue la eliminación mecánica de la placa y el cálculo subgingival mediante la utilización de instrumentos ultrasónicos y curetas (Walmsley et al., 2008); el tratamiento causal de la periodontitis incluye el control de los factores que promueven la formación del biofilm subgingival.

El raspado y alisado radicular tiene como objetivo la eliminación del biofilm subgingival y el restablecimiento de una superficie radicular biológicamente compatible para así poder detener la evolución de la enfermedad. Desde el punto de vista microbiológico, se persigue la reducción de la carga bacteriana total y la modificación de las condiciones ambientales de los nichos microbiológicos, eventos que estimulan cambios clínicos favorables (Haffajee et al., 2006).

En esta fase del tratamiento, el paciente debe prestar atención a las técnicas de higiene oral para así alcanzar unos resultados adecuados tras el tratamiento y poder mantener dichos resultados a largo plazo (Axelsson et al., 2004).

A partir de las seis semanas tras el tratamiento periodontal causal, se llevará a cabo una reevaluación de las variables clínicas. Cabe esperar una reducción en la profundidad de sondaje, una ganancia en los niveles de inserción clínica, una reducción en el sangrado al sondaje y un aumento de la recesión gingival dada la desinflamación de los tejidos gingivales (Dentino et al., 2013). Los pacientes en los que se observe la presencia de localizaciones con profundidades de sondaje mayores o iguales a 6 mm tras el tratamiento periodontal causal serán candidatos a recibir terapia periodontal avanzada (cirugía periodontal), ya que se ha demostrado que existe relación entre el número de localizaciones con dichas profundidades de sondaje y la pérdida de inserción de los tejidos periodontales (Claffey y Egelberg, 1995). Respecto a esto, un estudio prospectivo posterior (Matulienė et al., 2010) demostró que la presencia de bolsas periodontales generalizadas (nueve o más) mayores de 5 mm aumenta el riesgo de pérdida de dientes.

El objetivo de dicha terapia quirúrgica es reducir las profundidades de sondaje, reducir la carga bacteriana en el biofilm subgingival y facilitar la higiene oral por parte del paciente (Haffajee et al., 2006).

Tras el tratamiento periodontal causal (raspado y alisado radicular) y la posible fase de terapia periodontal avanzada (cirugía periodontal) se debe incluir al paciente en un programa estricto de visitas de mantenimiento periodontal. El objetivo de esta fase del tratamiento es prevenir la recidiva de la enfermedad (Axelsson y Lindhe, 1981; Dentino et al., 2013); la frecuencia de las visitas de mantenimiento periodontal se establecerá en base a los factores de riesgo que el paciente presente (Lang y Tonetti, 2003).

7.1.1. Eficacia y limitaciones microbiológicas del tratamiento periodontal causal

El raspado y alisado radicular ha demostrado una gran efectividad clínica (Hirschfeld y Wasserman, 1978; Kaldahl et al., 1996), sin embargo no está exento de limitaciones. Algunas de estas limitaciones tienen que ver con las dificultades para un

desbridamiento adecuado del biofilm subgingival, en determinadas localizaciones, como ocurre en las bolsas periodontales profundas (Brayer et al., 1989) o en localizaciones con lesiones de furcación (Kalkwarf et al., 1988). Otras limitaciones están relacionadas con la falta de especificidad desde el punto de vista microbiológico del raspado y alisado radicular; se ha observado que este tratamiento provoca una reducción de los recuentos totales de las bacterias presentes en el biofilm subgingival, disminuyendo las proporciones de patógenos periodontales y aumentando las de las especies bacterianas más beneficiosas, como son los estreptococos y otras especies Gram positivas aerobias (Haffajee et al., 1997).

A nivel más específico, el raspado y alisado radicular ha demostrado una reducción en la prevalencia y en el porcentaje de localizaciones colonizadas por *A. actinomycetemcomitans* (Shiloah y Patters, 1994), *P. gingivalis* (Shiloah y Patters, 1994; Renvert et al., 1990; Takamatsu et al., 1999; Colombo et al., 2005) y *T. forsythia* (Takamatsu et al., 1999; Colombo et al., 2005); sin embargo, diversos artículos han observado la correlación entre la persistencia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* tras el tratamiento de raspado y alisado radicular y la limitación en la mejoría de las variables clínicas o la recurrencia de la periodontitis (Renvert et al., 1990; Rams et al., 2006). En estos pacientes se ha propuesto la terapia antimicrobiana como coadyuvante al tratamiento periodontal causal, con el objetivo de reducir o eliminar los periodonto-patógenos y así alcanzar una mejoría consistente en las variables clínicas (Winkelhoff et al., 1996).

7.1.2. El uso de antimicrobianos sistémicos en el tratamiento periodontal causal

Una revisión sistemática analizó el uso de antibióticos sistémicos como coadyuvantes al desbridamiento mecánico del biofilm subgingival. Se observó un beneficio adicional en el uso coadyuvante de los antibióticos sistémicos con una reducción en la profundidad de sondaje, así como una disminución del riesgo de pérdida de inserción a nivel del paciente y a nivel de la localización, comparado con el raspado y alisado radicular como monoterapia. Esta observación fue consistente independientemente del tipo de periodontitis o del antibiótico utilizado; por ello, se propuso como una alternativa válida de tratamiento, particularmente en pacientes con determinados

perfiles microbiológicos, pacientes con periodontitis agresiva o con formas avanzadas de periodontitis (Herrera et al., 2002).

Un revisión sistemática posterior (Haffajee et al., 2003) confirmó que, a pesar de que existe suficiente evidencia para justificar el uso de los antibióticos sistémicos en el tratamiento de la periodontitis, la evidencia científica disponible es escasa respecto a su protocolo adecuado de uso. En relación con esto, una publicación posterior (Herrera et al., 2008) concluyó que el antibiótico sistémico debe prescribirse tras la última sesión de un adecuado raspado y alisado radicular, el cual, debe completarse con la mayor brevedad posible (una semana), acompañado de una exquisita higiene oral por parte del paciente. Por el contrario, no existe suficiente evidencia para justificar el uso de los antibióticos tras la cirugía periodontal.

En dicha revisión se evalúa la terapia con distintos antimicrobianos sistémicos comúnmente empleados como coadyuvantes al raspado y alisado radicular y se concluye lo siguiente:

Cuando se comparó el raspado y alisado radicular con o sin **amoxicilina**, se observan beneficios adicionales en términos de reducción de la profundidad de sondaje en el grupo con antibiótico (Herrera et al., 2008).

Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se evaluó la administración de **amoxicilina y ácido clavulánico** junto con el raspado y alisado radicular en tres artículos distintos, este resultado parece tener relación con la forma de administración ya que en uno de ellos se administró seis semanas tras el desbridamiento, y otros dos artículos sólo registraban la evolución de las localizaciones activas en pacientes con periodontitis “refractarias” (Herrera et al., 2008).

En el caso de la **azitromicina**, los artículos que incluían pacientes con periodontitis agresiva obtenían peores resultados que aquellos que sólo incluían pacientes con periodontitis crónica. Además, también influye el tiempo del desbridamiento, cuando era mayor de una semana los resultados eran peores que cuando se completaba entre 1 y 7 días (Herrera et al., 2008). En una revisión sistemática con meta-análisis se ha determinado un beneficio añadido en la reducción de las profundidades de sondaje y

ganancia de nivel de inserción clínica tras la administración de azitromicina sistémico junto con el raspado y alisado radicular comparado con el raspado en pacientes con periodontitis crónica. Es importante tener en cuenta la heterogeneidad en cuanto a posología y pauta de administración del antibiótico en artículos incluidos en esta revisión, incluso en uno de ellos se utiliza azitromicina tópica (Renatus et al., 2016). Una de las principales ventajas en la prescripción de este antibiótico es su sencilla posología, una pastilla de 500 mg, una vez al día, durante 3 días.

Respecto a la eficacia del **metronidazol** como coadyuvante al raspado y alisado radicular, en la revisión de Herrera et al., (2008) se analizaron catorce artículos, más de la mitad encontraron resultados favorables frente al raspado y alisado radicular como monoterapia. Se observa que no existe unanimidad en las posologías de metronidazol recomendadas, la cual es complicada de cumplir por los pacientes y esto puede llevar a un mal uso de dicho antimicrobiano y consecuentemente a unos peores resultados clínicos (Herrera et al., 2008). Un ensayo clínico reciente ha comparado, en pacientes con periodontitis crónica, la prescripción de 7 ó 14 días de la terapia antimicrobiana combinada de amoxicilina (250 mg) y metronidazol (250 mg ó 400 mg) junto con el raspado y alisado radicular frente al desbridamiento sin antibiótico; sólo cuando la posología del antibiótico era de dos semanas, independientemente de la dosis de metronidazol administrada, se alcanzaba un beneficio clínico adicional del antibiótico frente al desbridamiento como monoterapia (Borges et al., 2017). Además, es importante tener en cuenta los efectos adversos que produce el metronidazol, como es la interferencia con bebidas alcohólicas que puede provocar malestar general (Sharma et al., 2009).

Parece claro que, a pesar de que existe evidencia suficiente que avala la eficacia clínica del uso de antimicrobianos sistémicos como coadyuvantes a la terapia periodontal causal, no existe unanimidad en la posología ni en las pautas a seguir (Herrera et al., 2012).

8. Resistencias a antimicrobianos sistémicos

El uso de antibióticos sistémicos debe ser responsable ya que los niveles de resistencias a dichos fármacos es un problema real que concierne a las autoridades sanitarias y a la salud pública global a nivel mundial. En los últimos años, estas resistencias han experimentado un importante ascenso y responden, en muchas ocasiones, al consumo abusivo de antimicrobianos de amplio espectro o al incorrecto uso de los mismos. La evolución del sistema genético de las especies bacterianas les proporcionan un complejo mecanismo de resistencias a los antimicrobianos (Gootz, 2010).

En el caso de las **penicilinas**, las resistencias pueden ocurrir por una disminución de la permeabilidad de la bacteria al antibiótico, por la alteración de la unión de la penicilina y, más frecuentemente, por la producción de β -lactamasas; estas enzimas rompen el anillo β -lactámico característico de las penicilinas, desactivando las propiedades antimicrobianas de dicha molécula (Soares et al., 2012).

Este mecanismo de resistencia de las penicilinas varía significativamente entre países, depende en gran medida de la tasa de consumo del antimicrobiano y se relaciona directamente con el porcentaje de cepas productoras de β -lactamasas. En un artículo que comparó la población española y la holandesa, se encontró que más de la mitad de la población española analizada había consumido antibiótico en el último año frente al 10% de la población en el caso de Holanda. No es casualidad, por tanto, que la población española presentara mayor producción de β -lactamasas respecto a la población holandesa (Herrera et al., 2000). Dichas resistencias varían sustancialmente según la población; van Winkelhoff y cols. en el año 2000, compararon las resistencias a los antibióticos en España y Holanda. Las especies bacterianas en España mostraron un nivel de resistencia mayor frente a penicilina, amoxicilina, metronidazol, clindamicina y tetraciclina, comparado con la población holandesa analizada (Van Winkelhoff et al., 2000).

En el caso de los macrólidos, como la **azitromicina**, las resistencias se producen porque se limita el acceso de la droga a la célula diana, por la producción de enzimas

inactivadoras del propio macrólido o mediante una alteración del ribosoma que evita una unión adecuada al antibiótico (Soares et al., 2012).

En el caso del **metronidazol**, este antimicrobiano requiere para su activación la formación de unos metabolitos RedOx por parte de las bacterias Gram– asociadas con las enfermedades periodontales, en las que se ha detectado con menor frecuencia mecanismos de resistencia frente al mismo (Rams et al., 2011; Soares et al., 2012).

9. Evaluación de las susceptibilidades antimicrobianas

En condiciones ideales, la selección del antibiótico debería de realizarse en base al estudio del perfil microbiológico de cada paciente. Sin embargo, en la práctica clínica en muchas ocasiones se elige el antibiótico de manera empírica. Existen situaciones clínicas concretas en las que está indicado realizar un estudio de las susceptibilidades a los antimicrobianos, como es el caso de las periodontitis “refractarias” o cuando el agente antimicrobiano desempeña un papel fundamental en el resultado del tratamiento; en estos casos el estudio de las susceptibilidades persigue dirigir la decisión terapéutica de la prescripción del antimicrobiano.

En el caso de ser evaluadas, el valor obtenido en los test de susceptibilidad a los antimicrobianos se denomina concentración mínima inhibitoria (CMI), y se define como la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano. Dicho valor es comparado con una concentración predeterminada llamada “punto de corte” que se define como la concentración menor que el antimicrobiano alcanza en sangre o en los tejidos con la posología recomendada para inhibir el crecimiento bacteriano y que es establecida por una institución denominada *European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing* (EUCAST). Si el valor obtenido en los test de susceptibilidad (CMI) es menor al valor “punto de corte”, la cepa se considera susceptible a dicho antimicrobiano, y es resistente si el valor MIC es igual o mayor que el valor “punto de corte”.

Existen distintos métodos para evaluar las susceptibilidades:

- Procedimiento de dilución en agar.
- Técnica de dilución en microcaldo.
- Técnica de elución de disco en caldo.
- Técnica de difusión del disco.
- Sistema del test Epsilométrico (E-test®).
- Susceptibilidad de toda la placa.

El procedimiento de dilución en agar es el método de referencia, pero no está exento de limitaciones ya que es muy costoso y laborioso y se pueden valorar pocos antibióticos; una alternativa es el test Epsilométrico (E-test®) (AB Biodisk, Solna, Suecia) ya que es un método rápido y sencillo (Nachnani et al., 1992); este método ha sido ampliamente utilizado para el análisis de las susceptibilidades antimicrobianas en distintos países (Van Winkelhoff et al., 2005; Kulik et al., 2008; Ardila et al., 2010; Japoni et al., 2011; Veloo et al., 2012).

IV. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades periodontales tienen una alta prevalencia en España (Llodrá, 2012). Sus consecuencias funcionales y estéticas no se limitan a la cavidad oral, sino también a nivel sistémico ya que se ha comprobado, entre otras, su asociación con enfermedades cardiovasculares, con la alteración del control glucémico en diabéticos y con resultados adversos en el embarazo (Borgnakke, 2015; Ferreira et al., 2017).

La etiología de las enfermedades periodontales se ha asociado con bacterias que colonizan el biofilm subgingival (Rodenburg et al., 1990), entre estas, *A. actinomycetemcomitans* es un factor clave en el inicio y progresión de las enfermedades periodontales, en concreto de sus formas agresivas o refractarias (Slots, 1999).

La variabilidad genética de esta bacteria se ha hecho evidente tras el aislamiento, principalmente en una población marroquí, de una cepa altamente virulenta de *A. actinomycetemcomitans*, que recibe el nombre de clon JP2 y que afecta principalmente a sujetos adolescentes, en los cuales se ha encontrado una producción aumentada de leucotoxina. Haubek y cols. en el año 2008 demostraron, en un estudio prospectivo, que los pacientes portadores de dicho clon tenían un riesgo aumentado casi 20 veces de sufrir pérdida de inserción de los tejidos periodontales (Haubek et al., 2008).

A pesar de la alta prevalencia de periodontitis agresiva en Marruecos y a la variabilidad genética de *A. actinomycetemcomitans* en esta población (Haubek et al., 2001), sólo existe un artículo (Benrachadi et al., 2012) que ha indagado en la microbiota subgingival de la población marroquí. Por ello, parece razonable realizar un estudio ampliando este punto, comparando las variables clínicas y microbiológicas en los pacientes positivos y negativos para *A. actinomycetemcomitans* en Marruecos, y analizando además, en las cepas de este periodonto-patógeno, la distribución de los serotipos y la presencia de los factores de virulencia como la leucotoxina y la toxina citolítica.

Respecto al tratamiento, se ha determinado que los pacientes con periodontitis agresiva podrían beneficiarse de la prescripción de un antimicrobiano sistémico como coadyuvante al tratamiento mecánico convencional, el raspado y alisado radicular (Herrera et al., 2002). Este podría ser el caso en los pacientes marroquíes, en los que existe un perfil microbiológico y de afectación periodontal tan característico.

Para orientar esta decisión terapéutica, se hace relevante estudiar las susceptibilidades a los antimicrobianos de muestras de cepas de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* aisladas de pacientes marroquíes con periodontitis crónica y agresiva, ya que no disponemos de ningún artículo previo que haya analizado esta cuestión.

V. HIPÓTESIS

Hipótesis general

La prevalencia y la caracterización de la virulencia de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* en Marruecos es distinta a la de España, con una capacidad patogénica mayor en Marruecos que explicaría la elevada prevalencia de casos de periodontitis agresiva.

Hipótesis específicas

Artículo 1. La prevalencia y la virulencia de *A. actinomycetemcomitans* en España es inferior a la de otras poblaciones.

Artículo 2. Dentro de la población marroquí, la severidad de la periodontitis de los pacientes negativos para *A. actinomycetemcomitans* será menor comparada con aquellos pacientes positivos para este periodonto-patógeno, cuya virulencia será distinta a la descrita en otras poblaciones.

Artículo 3. La microbiota subgingival en pacientes marroquíes con periodontitis agresiva será compleja y no se asocia simplemente a una monoinfección por *A. actinomycetemcomitans*.

Artículo 4. En pacientes con periodontitis en Marruecos, tanto la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* como la susceptibilidad de estas cepas a la amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulánico, metronidazol y azitromicina serán distintas a las descritas en España.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar y comparar la relevancia de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis crónica y agresiva en España y Marruecos, estableciendo su prevalencia, factores de virulencia y susceptibilidades antibióticas.

Objetivos específicos

- Artículo 1. Estudiar la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en España, así como la distribución de serotipos, la variación en la secuencia de los genes que codifican la leucotoxina y la distribución del operón *cdt* en los pacientes con periodontitis en España.
- Artículo 2. Comparar, dentro de una población marroquí, los perfiles microbiológicos de los pacientes positivos y negativos para *A. actinomycetemcomitans* y estudiar la distribución de serotipos y la virulencia de las cepas de *A. actinomycetemcomitans*, en términos del operón del *cdt* y la variación en la secuencia de los genes que codifican la leucotoxina.
- Artículo 3. Caracterizar la microbiota subgingival en una población marroquí con periodontitis agresiva, analizando la presencia y el recuento, mediante cultivo, de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *P. intermedia/nigrescens*, *T. forsythia*, *E. corrodens*, *P. micra*, *Eubacterium spp.*, y *Capnocytophaga spp.*
- Artículo 4. Evaluar las susceptibilidades de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* frente a amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulánico, metronidazol y azitromicina, y comparar, por otra parte, los perfiles microbiológicos de los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, o para ambos.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS. RESULTADOS.

La descripción detallada del material y métodos, así como los resultados de la investigación han sido publicados como artículos científicos en cuatro publicaciones independientes con las siguientes referencias:

Artículo 1: Mínguez M, Pousa X, Herrera D, Blasi A, Sánchez MC, León R, Sanz M (2014) Characterization and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from a population of periodontitis patients in Spain. *Archives Oral Biology* 59(12): 1359-67.

Artículo 2: Mínguez M, Ennibi OK, Pousa X, Lakhdar L, Abdellaoui L, Sánchez M, Sanz M, Herrera D (2016) Characterization of *A. actinomycetemcomitans* strains in subgingival samples from periodontitis subjects in Morocco. *Clinical Oral Investigations* 20(7): 1809-1818.

Artículo 3: Chahboun H, Mínguez M, Herrera D, Sanz M, Ennibi OK (2015) Bacterial profile of aggressive periodontitis in Morocco: a cross-sectional study. *BMC Oral Health* 24: 15-25.

Artículo 4: Mínguez M, Ennibi OK, Perdiguero P, Lakhdar L, Abdellaoui L, Sánchez M, Sanz M, Herrera D Antimicrobial susceptibilities of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* strains from periodontitis patients in Morocco. *International Journal of Antimicrobial Agents* (enviado para publicación).

Artículo 1

Artículo 1:

Mínguez M, Pousa X, Herrera D, Blasi A, Sánchez MC, León R, Sanz M (2014) Characterization and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from a population of periodontitis patients in Spain. *Archives Oral Biology* 59(12): 1359-67.

Caracterización y distribución de serotipos de muestras de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* aisladas en pacientes con periodontitis en España.

Antecedentes y objetivos: No existe ningún artículo que caracterice la variabilidad genética en términos de factores de virulencia de las muestras de *A. actinomycetemcomitans* de pacientes con periodontitis en España. El objetivo de este artículo es caracterizar la distribución de los serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, así como el polimorfismo de los genes que codifican para la leucotoxina y el operón de la toxina citolítica.

Material y métodos: Se analizaron las muestras de placa subgingival de un total de 701 pacientes con periodontitis, de los cuales, 40 mostraron cepas *A. actinomycetemcomitans* entre sus recuentos bacterianos. Además de analizar las variables clínicas de estos pacientes, se aislaron de 1 a 3 cepas de *A. actinomycetemcomitans* en cada uno de ellos para caracterizarlas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Resultados: La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* mediante cultivo fue 5.7%. El serotipo “b” fue el más frecuente. 30 pacientes mostraron infección por un solo serotipo mientras 7 pacientes mostraron co-infección, principalmente con serotipos “a” y “b”. De las 79 cepas aisladas, 24 eran serotipo “a”, 30 fueron serotipo “b”, 12 serotipo “c” y 4 serotipo “d”. Ninguna cepa mostró la delección de 530 pares de bases en la región promotora de la leucotoxina que caracteriza la cepa JP2. El 65.8% de las cepas fueron Cdt positivas.

Conclusiones: Los serotipos más comunes fueron el “a” y el “b” siendo éste último el más prevalente en casos de monoinfección. Los serotipos “e” y “f” no se detectaron. En el 65.8% de las muestras fueron Cdt positivas y, a pesar de que en el 100% de las

cepas se hallaron los genes que codifican para la leucotoxina, no se encontró ninguna cepa JP2.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

Characterization and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from a population of periodontitis patients in Spain

María Mínguez^a, Xiana Pousa^a, David Herrera^{a,c,*}, Andrea Blasi^b,
Mari Carmen Sánchez^b, Rubén León^b, Mariano Sanz^{a,c}

^a Section of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain

^b Laboratory of Research, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain

^c ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, University Complutense, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 27 July 2014

Keywords:

Aggregatibacter
actinomycetemcomitans
Spain
Serotype
Periodontitis
Polymerase chain reaction

ABSTRACT

Objective: There is no study characterizing the variability of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates in periodontitis patients in Spain. It is therefore the aim of this investigation to study the serotype distribution of *A. actinomycetemcomitans* strains isolated from periodontitis patients in Spain. The polymorphism of the genes that codifies the leukotoxin and the operon of the cytolethal-distending toxin (*cdt*) will also be investigated.

Design: From a total of 701 patients samples, 40 *A. actinomycetemcomitans*-positive periodontitis patients were included in the study (mean age 45.3, 62.5% females) and their clinical periodontal status was assessed. On average, 1–3 isolates from each patient were sub-cultured and characterized by PCR.

Results: Using culture the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* was 5.7%. The most frequent serotype was “b”, being 30 patients infected by a unique serotype, while 7 patients showed co-colonization, mostly with serotypes “a” and “b”. From the 79 pure isolates obtained, 24 were from serotype “a”, 30 from serotype “b”, 12 from serotype “c” and 4 from serotype “d”. Further characterization of these samples showed that none of these 79 isolates demonstrated the 530-bp deletion in the leukotoxin’s promoter region that characterizes the JP2 strain. Conversely 65.8% of the isolates were *cdt*+

Conclusions: The most common serotypes were “a” and “b”, being serotype “b” the most prevalent in mono-colonization, while serotypes “e” and “f” were not detected. In the majority of samples, operon that codifies the *cdt* (65.8%) and the genes responsible for the codification of leukotoxin (100%) were found. None of the isolates were JP2 strains.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Section of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Plaza Ramón y Cajal S/N, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913941907; fax: +34 913941910.

E-mail address: davidher@ucm.es (D. Herrera).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.07.021>

0003-9969/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The aetiology of periodontal diseases has been associated with microorganisms colonizing the subgingival biofilm.¹ Among these, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* has received particular attention and it is regarded a major pathogen, being a key factor in the aetiology of early onset and refractory forms of periodontitis.^{1–4} This notion is derived primarily from association studies, conducted in North America and Europe, which significantly correlated the presence and amount of these microorganisms with the presence and severity of disease and also linked a worse than expected treatment outcome with presence of high levels of *A. actinomycetemcomitans* after therapy. In prospective studies, its presence has also been identified as a risk factor for the onset of periodontitis.⁵ On the other hand, *A. actinomycetemcomitans* has also been frequently detected in subjects without clinical evidence of periodontal disease, what suggests that either not all subjects are equally susceptible or that there are variations in the virulence and the pathogenic potential of this microorganism.

Based on the presence of specific capsular proteins able to elicit a subject's differential antibody response, six serotypes (from "a" to "f") of *A. actinomycetemcomitans* have been identified.⁶ This genetic variability has been associated to differential virulence since *A. actinomycetemcomitans* serotype "b" has been linked to periodontitis lesions, while serotypes "a" and "c" demonstrated a stronger association with periodontal health.^{2,7–9} A similar serotype-dependent differential virulence has also been suggested for *Porphyromonas gingivalis*.^{10,11}

The global *A. actinomycetemcomitans* serotype distribution is not homogeneous and the association between serotype and periodontal status may depend on the geographical location and/or ethnicity of the studied population.^{12–15} For example, Yang (2004) found that serotype "b" was more often isolated in aggressive than chronic forms of periodontitis in a large population in Philadelphia.¹⁶ Although most studies suggest that *A. actinomycetemcomitans* colonization occurs through one unique serotype, others have shown infected subjects with two or three serotypes.^{7,17–20}

A. actinomycetemcomitans has also demonstrated other forms of genetic diversity also linked to virulence traits, mostly in relation to its capacity to produce leukotoxin, a protein that specifically destroys human polymorphonuclear leukocytes.^{21–23} There are, however, significant variations in the leukotoxin production demonstrated among different isolates.^{10,23} The mechanism by which the most virulent species produce high levels of leukotoxin was identified by a 530-bp deletion in the region upstream of the leukotoxin gene operon (*lxt*), which encodes this protein, thus bringing a second strong promoter and producing high amounts of this toxin. The majority of strains of this highly leukotoxic clone were isolated from subjects of African descent. Haubek et al. demonstrated, in a population based longitudinal study of 700 adolescents, that the JP2 strain of *A. actinomycetemcomitans* was the etiological agent of the aggressive forms of periodontitis in adolescents living in or originating from North and West Africa.²⁴ Individuals who carried the JP2 clone

of *A. actinomycetemcomitans* had a significantly increased risk of periodontal attachment loss, either alone (relative risk 18.0) or together with the presence of non-JP2 clones of *A. actinomycetemcomitans* (12.4). A much less pronounced disease risk was found in those carrying non-JP2 clones only (3.0).

Another identified virulence factor associated to this bacterial species is the cytolethal distending toxin (Cdt), which blocks the progression of the cell cycle in specific types of eukaryotic cells and other cell lines, specifically oral epithelial cells and T lymphocytes. This holotoxin, which has only been identified in *A. actinomycetemcomitans* isolated from the human oral cavity is made up of three subunit proteins designated as CdtA, CdtB and CdtC and different studies have reported that this cytotoxic Cdt activity is also heterogeneous among *A. actinomycetemcomitans* isolates. In a study by Ahmed et al., 86% of *A. actinomycetemcomitans* isolates presented the complete operon and its characteristic cytotoxic activity.^{25,26} Tan et al. showed a close association between aggressive forms of periodontitis and *A. actinomycetemcomitans* strains positive to the Cdt genotype.²⁷

In summary, numerous studies have shown that the genetic diversity in *A. actinomycetemcomitans* strains may be associated to geographical diversity, thus suggesting a differential virulence.^{7,9,21,28,30} Since there are no studies in Southern Europe evaluating the differential virulence of *A. actinomycetemcomitans* isolates in periodontitis patients, it is the objective of this investigation to study the serotype distribution of *A. actinomycetemcomitans*, the variation in the sequences of the genes that codify the leukotoxin and the distribution of the *cdt* operon in periodontitis patients in Spain.

2. Materials and methods

2.1. Patient selection and sample reception

The bacterial isolates used in this study were obtained from a consecutive series of subgingival microbial samples from Spanish patients sent to the Laboratory of Microbiology at Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain, for microbial diagnosis over 18 months from January 2007 to July 2008. The patient residence was Spain and ethnicity Caucasian in all cases. All samples were taken from patients as part of their periodontal diagnostic process, and they were informed about the benefits of the microbiological diagnosis, an overview of the microbiological procedures and that, eventually, some of the cultured colonies could be isolated for further processes, including definitive identification. Verbal consent was obtained from all patients.

Samples from patients with a clinical diagnosis of chronic or aggressive untreated periodontitis according to the American Academy of Periodontology 1999 classification were included.³¹ Sample from patients categorized as "refractory" periodontitis as a separate group were also included, when these subjects had a recurrence of disease after treatment or when the treatment outcome was not appropriate.

These microbiological samples were collected by periodontists in private practices as well as by postgraduate students in the Postgraduate Clinic of Periodontology in the same Faculty of Odontology. Each sample was accompanied by

clinical information including patient age, gender, clinical diagnosis, brief clinical and drug intake history, smoking status, sample sites and time and date of sampling. The clinical parameters: probing pocket depth (PPD), gingival recession, presence or absence of plaque (PI), bleeding on probing (BOP) and suppuration were recorded at the four selected sites from which samples were taken. These sites represented the deepest pocket with bleeding in each quadrant and after careful removal of supragingival plaque and isolation with sterile cotton rolls and gentle air drying, two consecutive sterile paper points (medium size, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) were inserted as deep as possible in the pocket, and left in place for 10 s.³² The paper points were transferred to a vial containing 1.5 ml of Reduced Transport Fluid (RTF), and pooled with all the other paper points.³³ The vial was sent to the laboratory and processed within 24 h.

Only samples were selected when belonging to patients with at least four sites with (PPD) deeper than 4 mm and clinical attachment loss (CAL) higher than 4 mm. Samples from subjects with fewer than 16 teeth and from patients who had taken any antibiotic medication within the previous three months were excluded.

2.2. Culture, isolation and storage

Samples were homogenized with a vortex and 10-fold serially diluted in Phosphate sodium buffer (PBS) and aliquots of 100 µl were plated in two different media: Blood agar medium (No. 2 of Oxoid; Oxoid Ltd., Basingstoke, England), with 5% horse blood, and haemin (5 mg/l) and menadione (1 mg/l) and Dentaïd-1 medium.³⁴

Blood agar plates were studied after 7 and 14 days of anaerobic incubation (80% N₂; 10% H₂; 10% CO₂ at 37 °C). Plates were carefully examined and based on the morphology of the isolated colonies the following pathogens were identified: *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens* and *Fusobacterium* spp. Colonies from each pathogen were counted as the total number from a representative plate (between 30 and 300 colonies). The specific media, Dentaïd-1 was used for the selective isolation and growth of *A. actinomycetemcomitans*. Plaques with this media were incubated at 37 °C in air with 5% CO₂ and after 3–5 days were carefully examined for the identification of *A. actinomycetemcomitans*. This identification was based on its typical colony morphology, a catalase reaction and a set of specific enzymes (Rapid ID, NH system

Romel Inc., USA). One to three isolates per subject were subcultured and purified. All original samples were stored at –80 °C until further use. Only positive isolates for *A. actinomycetemcomitans* were included in this investigation.

2.3. Isolation of genomic DNA

Bacterial cells were collected after centrifugation and re-suspension in 1 ml of Tris–HCl 10 mM, EDTA 0.8 mM (pH 8.0) and lysozyme (final concentration 5.0 mg/ml). They were then incubated at 37 °C for 30 min and proteinase K was added until reaching a final concentration of 2 mg/µl, 1 mg/µl and 1%, respectively.³⁵ The DNA was then extracted with equal volumes of phenol (saturated with 10 mM Tris–HCl, pH 8.0) and phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25:24:1). Bulk nucleic acids were precipitated from the solution using ethanol followed by centrifugation (12,000 rpm) for 10 min. The DNA precipitate was re-suspended in 50 µl of sterile distilled water. The result of the DNA extraction was assessed by electrophoresis. A 5 µl aliquot of extracted DNA was electrophoresed through a 1.0% agarose gel, in a Tris–acetate EDTA (TAE) buffer. The gel was stained with ethidium bromide (10 µg/ml) and visualized under UV-illumination.

2.4. Serotyping of strains

Serotypes “a” to “f” were determined by the PCR technique, based on specific sequences from the gene clusters responsible for the distinct serotypes. The PCR reaction was performed with the specific primers described by Kaplan for the identification of the serotypes “a” to “f”.⁶ The sequences of the primers used are listed in Table 1. The PCR reaction was performed in a 25 µl final volume containing 2.5 µl of 10x PCR buffer, 1.0 µl of 25 mM MgCl₂, 0.5 µl of 10 mM deoxynucleoside triphosphates, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, CA, USA), 1.0 µl of 25 µM primers and 2 µl of genomic DNA. A 15 µl aliquot of each PCR is electrophoresed through a 1.0% agarose gel in 1x TAE buffer, the PCR products are visualized by staining with ethidium bromide (10 mg/ml) and visualized under UV illumination. These PCR assays were performed including positive and negative controls in an iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc.). After the initial step of denaturation at 96 °C for 3 min, a total of 35 PCR cycles were performed; each cycle consisted of 30 s of denaturation at 95 °C, 1 min of annealing at 55 °C and 72 °C for 2 min, and a final step of extension at 72 °C for 10 min.

Table 1 – Primers described by Kaplan et al.⁶ selected for the PCR serotyping of *A. actinomycetemcomitans*.

Primer	Sequence (5'–3')	Serotype	PCR product size
P11	TCTCCACCATTTTGTAGTGG	b	333 pb
P12	GAAACCACTTCTATTTCTCC	c	268 pb
P13	CCTTTATCAATCCAGACAGC	f	232 pb
P14	AAAACCTCTCATCGGGAATG		
P15	TGGGTCATGGGAGGTAATCC	a	293 pb
P16	GCTAGGAACAAAGCAGCATC		
P17	TGGAACGGGTATGGGAACGG	d	411 pb
P18	GGATGCTCATCTAGCCATGC		
P19	ATCCAGCCTTTGGTTCTC	e	311 pb
P20	TGGTCTGCGTTCTAGGTTGG		

2.5. Detection of putative leukotoxin overproducers

The deletion of 530 bp in the promoter region of the leukotoxin gene was determined in every isolate by means of PCR. The PCR primers and conditions for detecting the JP2 strain were those described by Haubek et al.,²⁹ The PCR reaction was performed in a 25 µl final volume containing 2.5 µl of 10x PCR buffer, 1.0 µl of 25 mM MgCl₂, 0.5 µl of 10 mM deoxynucleoside triphosphates, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, CA, USA), 1.0 µl of 25 µM primers and 2 µl of genomic DNA.

PCR primer upstream from the deletion had the sequence 5'-CAGATCAAAACCTGATAACAGTATT-3', and the primer downstream from the deletion had the sequence 5'TTTCTCCATAT-TCCCTCCTTCTGT-3'. The PCR temperature profile included an initial step of denaturation at 94 °C, a total of 30 cycles of denaturation for 1 min at 94 °C, annealing for 1 min at 60 °C, and a final step of extension at 72 °C for 2 min. The PCR fragment of 504 bp indicated deletion of 530 bp corresponding to the JP2 strain whereas a PCR fragment of 1034 bp indicated no deletion in the *A. actinomycetemcomitans* leukotoxin operon. Positive and negative controls were included in the PCR. The molecular weights of the PCR products were determined by visualization and comparison with standard molecular weight markers using agarose gel electrophoresis.

2.6. *cdt* detection

The distribution of the *cdt* operon was also determined by means of PCR using the same procedure previously described for Ltx but using the primers that amplify the complete operon *cdtA1* and *cdtC2*, which are listed in Table 2. The total molecular weight of the amplified segment was of 2016 bp when the complete operon was present. The PCR products were also determined by visualization in 1.0% agarose gel.

2.7. Data analyses

Descriptive statistics, including frequency distribution were used to characterize the sample in terms of the different serotypes, the variation in the sequences of the genes that codify the leukotoxin and the distribution of the *cdt* operon. Further subgroup analysis was performed to assess the differences in serotype, leukotoxin and *cdt* gene over-production according to the different clinical diagnoses: chronic, aggressive or refractory, as well to other clinical and patient variables.

For continuous variables, ANOVA test was used to compare different disease categories, with the multiple rank test as the post hoc test. For categorical variables, contingency tables were constructed and compared by means of chi-square test. The software used for the analyses was Statgraphics Plus 5.1 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

3. Results

3.1. Demographics

From a total of 701 patient samples processed, 396 samples were taken in 25 private practices throughout Spain (16 were located in Madrid area), and 305 from patients seeking treatment in the Section of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain. Out of these 701 patients, 40 (5.7%) fulfilled the inclusion criteria and were positive for *A. actinomycetemcomitans*. These patients had a mean age of 45.2 years (ranging 24–68) and were predominantly non-smokers 62.5% (25). They were stratified in three groups according to their periodontal condition and 19 (47.5%) were diagnosed of chronic periodontitis, 13 (32.5%) of aggressive periodontitis and 8 (20%) of “refractory” periodontitis. “Refractory” periodontitis patients had significantly more recession ($p = 0.010$) and shallower pockets (tendency towards statistical significance, $p = 0.051$) than chronic and aggressive periodontitis patients. Similar CAL levels (7.5–7.7 mm), BOP proportions (78–85%) and plaque index (40–45%) were observed among the three patient groups. Patients with aggressive periodontitis were significantly younger ($p < 0.001$) than chronic periodontitis or refractory patients. The detailed periodontal status, clinical and demographic variables of these 40 patients are depicted in Table 3. No differences among the three groups were observed for either smoking or gender (Table 4).

3.2. Patient-based results

3.2.1. Serotype distribution (Table 4)

Overall, 75% of the patients were characterized by a unique serotype, while 17.5% harboured two serotypes and in 7.5% of the patients the serotype could not be characterized (although *A. actinomycetemcomitans* was confirmed by PCR using different primers). In the patients where a unique serotype was identified, “a” or “b” serotypes were detected in 60% of the patients, while in those patients with more than one serotype, 4 different co-colonization profiles were detected, with 1–3 patients each.

Table 2 – Primers used for the detection of the presence of the *cdt* operon of *A. actinomycetemcomitans* (designed for this study).

Primer	Sequence (5'–3')	Gen	PCR product size
CdtA ₁	ATGAAGAAGTTTTACCTGGTC	CdtA	669
CdtA ₂	TAATTAAGGGGTCAAGCTTCT		
CdtB ₁	TGCAATCCCATTTCGAATTA	CdtB	851
CdtB ₂	TTAGCGATCACGAACAAAAC		
CdtC ₁	CTTTAGGTACATGTATTGAA	CdtC	560
CdtC ₂	TTAGCTACCGCTGATTTC		

Table 3 – Demographic and clinical characteristics, expressed as mean and standard deviation (SD) of patients in each disease category.

	All		Aggressive		Refractory		Chronic		p value
	n	%	n	%	n	%	n	%	
	40	67.5%	13	32.5%	8	20.0%	19	47.5%	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Age	45.3	9.9	36.6	7.6	45.8	7.9	51.0	7.7	<0.001 ^a
PPD	6.7	1.2	6.9	1.4	5.9	1.0	7.0	0.9	0.051 ^b
REC	1.0	0.9	0.6	0.6	1.8	1.4	0.9	0.6	0.010 ^c
CAL	7.7	1.3	7.5	1.7	7.7	1.7	7.8	0.9	0.793
BOP	78.1%	31.1%	84.6%	19.2%	84.4%	22.9%	71.1%	39.3%	0.403
PI	45.0%	42.4%	46.2%	41.9%	40.6%	42.1%	46.1%	45.1%	0.951
SUP	19.0%	31.5%	13.5%	30.0%	31.3%	45.8%	17.5%	25.3%	0.448

PPD, probing pocket depth, in mm; REC, recession, in mm; CAL, clinical attachment level, in mm; BOP, bleeding on probing, in percentage; PI, plaque index, in percentage; SUP, suppuration, in percentage.

^a Post hoc multiple rank test: younger age for aggressive periodontitis versus the other two groups.

^b Post hoc multiple rank test: shallower pockets for refractory periodontitis versus the other two groups.

^c Post hoc multiple rank test: more recession for refractory periodontitis versus the other two groups.

When assessing the serotype distribution according to clinical diagnosis, refractory patients showed a clear predominance of serotype “b” (either alone in 50% of the cases, or combined with serotype “a” in 25% of the patients) and the frequent presence of more than one serotype (37.5%). In

aggressive periodontitis, mono-colonization with “a” and “b” serotypes occurred in 25% and 35% of the cases, respectively. A less clear pattern was observed for chronic periodontitis, with similar figures for serotypes “a”, “b”, “c”, not-typeable and co-colonization.

Table 4 – Characterization of patients in terms of smoking, gender, number of strains analyzed, serotype and cdt of *A. actinomycetemcomitans*.

	All		Aggressive		Refractory		Chronic	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Smoking								
No	27	67.5%	11	84.6%	4	50.0%	12	63.2%
Current	11	27.5%	2	15.4%	2	25.0%	7	36.8%
Former	2	5.0%	0	0.0%	2	25.0%	0	0.0%
Gender								
Female	25	62.5%	8	61.5%	5	62.5%	12	63.2%
Male	15	37.5%	5	38.5%	3	37.5%	7	36.8%
No of strains								
1	9	22.5%	2	15.4%	0	0.0%	7	36.8%
2	23	57.5%	6	46.2%	8	100.0%	9	47.4%
3	8	20.0%	5	38.5%	0	0.0%	3	15.8%
Serotype								
a	10	25.0%	5	38.5%	0	0.0%	5	26.3%
b	14	35.0%	6	46.2%	4	50.0%	4	21.1%
c	4	10.0%	1	7.7%	0	0.0%	3	15.8%
d	2	5.0%	0	0.0%	1	12.5%	1	5.3%
NT	3	7.5%	0	0.0%	0	0.0%	3	15.8%
*cocolonization	7	17.5%	1	7.7%	3	37.5%	3	15.8%
a.c	2	5.0%	0	0.0%	1	12.5%	1	5.3%
b.c	1	2.5%	1	7.7%	0	0.0%	0	0.0%
a.b	3	7.5%	0	0.0%	2	25.0%	1	5.3%
c.d	1	2.5%	0	0.0%	0	0.0%	1	5.3%
cdt								
cdt+	22	56.41%	6	46.15%	4	50.00%	12	66.67%
cdt–	6	15.38%	3	23.08%	0	0.00%	3	16.67%
Mixed	11	28.21%	4	30.77%	4	50.00%	3	16.67%

n, number of patients; %, percentage; NT, not typeable; cdt, cytolethal distending toxin; in italics, since the figures represent the overall number of patients with more than one serotype, with the specific combinations described in the following rows.

Table 5 – Strain-based analysis: distribution of serotypes, leukotoxin and *cdt* of *A. actinomycetemcomitans*.

	n	Percentage
Serotype		
a	24	30.4%
b	30	38.0%
c	12	15.2%
d	4	5.1%
NT	9	11.4%
Leukotoxin		
No	0	0.0%
Yes	79	100.0%
<i>cdt</i>		
No	27	34.2%
Yes	52	65.8%

NT, not typeable; *cdt*, cytolethal distending toxin.

3.2.2. *cdt* operon detection (Table 4)

Cdt positive samples were identified four times more frequently. Presence of Cdt positive and negative isolates in the same patient was observed in 28% of the cases. No Cdt negative samples were observed in refractory patients, while in chronic periodontitis there was also a clear predominance of Cdt positive profiles (67%).

3.3. *lktC* promoter deletion

No highly leukotoxic JP2 strains (identified by the presence of a 530-bp deletion in the promoter region of the *lktC* gene of *A. actinomycetemcomitans*) were identified in this studied population. In all the isolates, a clear band in the 1.0% agarose gel, equivalent to a molecular weight of 1034-bp was observed.

3.4. Strain-based results

From the 40 positive samples, 79 strains were isolated and studied corresponding to serotype “a”, 24 strains (30.4%), to serotype “b”, 30 strains (38%), to serotype “c”, 12 samples (15.2%) and to serotype “d”, 4 samples (5.1%). Mono-colonizations with serotypes “e” or “f” were not identified and the serotype could not be determined in 9 of these strains (11.4%). All strains were positive for the *ltx* gene. The *cdt* gene was detected in 52 out of the 79 strains of periodontitis patients (65.8%).

The distribution of the *cdt* gen among Table 5 different serotypes (Table 6) showed a clear predominance of *cdt* positive strains in serotype “a” and, to a lesser extent, in serotype “c”, while an almost even distribution was observed

for serotypes “b” and “d”. The differences between serotypes “a” and “b” were statistically significant ($p = 0.042$).

4. Discussion

The main findings of this investigation show that among the 40 patients where *A. actinomycetemcomitans* was detected 75% carried a unique serotype, while 17.5% were colonized by two serotypes. The most predominant serotypes were “a” and “b” and none of the isolates were highly leukotoxic strain JP2 and while 65.8% were positive for the *cdt* gene.

Using bacterial culturing the obtained prevalence of *A. actinomycetemcomitans* in this adult periodontitis population from Spain was of 5.7%. Previous reports from our research group have shown similar prevalence data using culture (6.3%) in a similar Spanish population, although using PCR methods the prevalence rose to 18.8%.³⁶ A similar low prevalence (3.2%) was also reported when studying a comparable population in Spain, but with the use of different culture medium (TSVB, Tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin),³⁷ also reporting a low recovery rate.³⁴ In other geographical locations, the reported prevalence of *A. actinomycetemcomitans* in periodontitis patients varies substantially depending on the microbial detection technologies used, with proportions ranging between 3% and 38% in United States of America and 15% in Sri Lanka when using immunofluorescence.^{35–38} With the use of bacterial culturing the reported prevalence of *A. actinomycetemcomitans* has varied between 5.4% in a group of aggressive periodontitis patients in Jamaica to 18% in Germany or 54.4% in Ghana.^{39–41} These prevalence can rise to 83% in China and to 93% in Thailand when using DNA-DNA checkerboard hybridization.^{42,43} With PCR the reported prevalence was 23.5% in United States of America, 19% in a Thai population, between 17.5% and 25% in Brazil, from 30% to 47.7% in Germany, 26.7% in Korea, 27.5% in a Greek population and 44% in Haiti.^{40,44–51}

From the 40 *A. actinomycetemcomitans*-positive samples studied, 79 strains were isolated and studied, being the serotype “b” the most frequent, followed by serotype “a”, both representing 68.4% of all the strains. These findings are in accordance with other studies assessing populations from different geographical locations, which have also reported predominance in *A. actinomycetemcomitans* serotypes “a”, “b”, and “c”, including Germany.⁵² In the United States of America, serotype “b” strains were more frequently isolated from patients with localized juvenile periodontitis (LJP) when compared to other periodontal conditions or periodontally healthy subjects.^{7,9} Listgarten et al. reported that elevated antibody responses to serotype “a” were more common in

Table 6 – Strain-based analysis: *cdt* distribution among distinct serotypes.

	Serotype a	Serotype b	Serotype c	Serotype d	Serotype NT
n <i>cdt</i> –	4	14	4	2	3
n <i>cdt</i> +	20	16	8	2	6
n total	24	30	12	4	9
% <i>cdt</i> –	16.7%	46.7%	33.3%	50.0%	33.3%
% <i>cdt</i> +	83.3%	53.3%	66.7%	50.0%	66.7%

NT, not typeable; *cdt*, cytolethal distending toxin.

chronic periodontitis patients.⁵³ In this investigation, we have identified not only a higher percentage of serotype “a” strains in chronic periodontitis patients, but also in aggressive periodontitis patients, in which the most common is the serotype “b”, like in the refractory periodontitis group. On the contrary, Dogan et al. reported that serotype “a” was the most frequent serotype in LJP subjects while in adult periodontitis subjects no differences among the serotypes “a”, “b” and “c” were reported.⁵⁴ A higher frequency of serotype “b” was reported in Finnish patients with periodontitis, while “c” was more often related to periodontally healthy subjects.^{9,20} In Asian populations, such as in Korea and Japan or in European countries, such as in Greece, the serotype “c” was also frequently associated with periodontally affected sites.^{19,20,50,55} Strains with serotypes “d”, “e” and strains without detectable serotype were also identified in Japanese subjects in proportions of 5%, 23% and 10%, respectively.^{18,54} These serotypes are less frequently found than “a”, “b” and “c” serotypes.^{10,17,18,54,56}

This investigation demonstrated that the genes responsible for the codification of the Ltx were present in all the strains (100%), but none showed the JP2 clone responsible of the highly leukotoxic strains. These highly virulent *A. actinomycetemcomitans* strains have been detected mainly in subjects of African origin, with proportions of 8.8% reported in Ghana adolescents and 77% in Moroccan patients with a diagnosis of aggressive periodontitis and with a higher risk of periodontal attachment loss.^{41,57} JP2 clone strains have also been reported in other distant geographical populations, such as in Thailand, but has been found to be absent in Greece.^{45,49} In a German population, and using PCR, the JP2 clone was found to be present in 2 out of 99 (2%) of the recruited patients and, in both cases, the subjects were immigrants of African origin suffering from chronic periodontitis.⁵² Using a characterization method of point mutations within housekeeping genes and pseudogenes, Haubek et al. developed a model of global spreading of the JP2 clone.⁵⁸ According to this model, the patterns of mutation suggest that the JP2 clone emerged from a distinct genotype in the Mediterranean Africa approximately 2400 years ago and spread subsequently to West Africa and to other parts of the world. In fact, in Brazil colonization by highly leukotoxic *A. actinomycetemcomitans* was associated with increased periodontitis severity.³⁶ Even though JP2 clone strains have almost been exclusively detected among individuals in North-Africa or from African descent limited information is still available regarding the microbiological status of this clone in Caucasians. In fact, this study has shown that a Spanish population, although being in close relation to North African populations (namely, Moroccan populations), due to geographical and immigration factors, did not harbour any highly leukotoxic strains.

This investigation also evaluated the third factor of genetic variability of *A. actinomycetemcomitans*, the *cdt* gene, being detected in 65.8% of the strains from periodontitis patients. The reported prevalence of this toxin in *A. actinomycetemcomitans* strains is highly variable. It has been found to be present in 45.5% of a chronic periodontitis patient sample in Germany.⁵² Ahmed et al. found 43 of 50 strains from periodontitis patients contained all three *cdt* genes and expressed Cdt activity.²⁶ Similarly, Fabris et al. reported Cdt activity in 39 out of 40 patients.⁵⁹ In another study, however,

only 13 out of 106 diseased sites were positive for these genes.²⁸

It is important to highlight the limitations of the present observational study, since a limited number of strains were studied and due to the low prevalence of *A. actinomycetemcomitans* in Spanish periodontitis patients the obtained associations only allowed us to generate hypothesis, rather than to establish clear conclusions. Moreover, in 22.5% of the patients, only one strain was studied and therefore, the results from the co-colonization of different strains per patient should be taken with caution. Similarly in a small number of patients, strains with non-attributable serotype were identified, which may belong to the serotype e’ described by van der Reijden et al., since we did not use this specific primer, that was described after our samples were analyzed.⁶⁰ Furthermore, the stratification used according to the patient’s clinical diagnosis should also be taken with caution since different clinicians, not using uniform criteria, did the diagnosis. In spite of this, the study showed the high variability in the genetic variance of *A. actinomycetemcomitans*, which has been also reported in similar studies. This variability may be explained, in part, by the different bacterial detection techniques used in the different laboratories, but also due to differences in ethnicity, geographic location and the periodontal condition of the populations sampled. Further studies should evaluate whether the presence of certain pathogenic bacterial species is associated with periodontitis and attachment loss in some population groups but not in others, depending on the presence of specific virulence traits.

In conclusion, this research has evidenced that, in samples from a group of Spanish patients with periodontitis, the most common *A. actinomycetemcomitans* serotypes found were “b” and “a”, while “e” and “f” were not detected. The genes responsible for the codification of leukotoxin were detected in all the strains, although none belonging to the JP2 strain. The operon that codifies the *cdt* was also detected in the majority of the samples (65.8%).

Funding

None.

Competing interests

None declared

Ethical approval

Not required.

Acknowledgements

We thank for their technical assistance Arancha Llama-Palacios, María José Marín, Itziar González and Ana O’Connor from Laboratory of Dental Research, University Complutense, Madrid.

REFERENCES

- Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Goene RJ, Abbas F, de Graff J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* 1990;17(6):392–9.
- Ebersole JL, Sandoval MN, Steffen MJ, Cappelli D. Serum antibody in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-infected patients with periodontal disease. *Infect Immun* 1991;59(5):1795–802.
- Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000 1999;20:82–121.
- Report C. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996;1:926–32.
- Van der Velden U, Abbas F, Armand S, Loos BG, Timmerman MF, Van der Weijden GA, et al. Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol* 2006;33(8):540–8.
- Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D, Fine DH. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol* 2002;40(4):1181–7.
- Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* 1983;54(12):707–11.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:78–111.
- Asikainen S, Chen C, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10(2):65–8.
- Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun* 1983;41(1):19–27.
- van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* 2000 1999;20:122–35.
- Holtta P, Alaluusua S, Saarela M, Asikainen S. Isolation frequency and serotype distribution of *mutans streptococci* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand J Dent Res* 1994;102(2):113–9.
- Celenligil H, Ebersole JL. Analysis of serum antibody responses to periodontopathogens in early-onset periodontitis patients from different geographical locations. *J Clin Periodontol* 1998;25(12):994–1002.
- Dahlen G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontol* 2000 2002;28:206–39.
- Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol* 2007;45(12):3859–69.
- Yang HW, Asikainen S, Dogan B, Suda R, Lai CH. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol* 2004;75(4):592–9.
- Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhala L, Lai CH, Jousimies-Somer H. Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7(5):277–9.
- Mombelli A, Gmur R, Lang NP, Corbert E, Frey J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. *J Clin Periodontol* 1999;26(8):505–10.
- Chung HJ, Chung CP, Son SH, Nisengard RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1989;60(9):506–11.
- Asikainen S, Lai CH, Alaluusua S, Slots J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6(2):115–8.
- Poulsen K, Theilade E, Lally ET, Demuth DR, Kilian M. Population structure of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a framework for studies of disease-associated properties. *Microbiology* 1994;140(Pt 8):2049–60.
- Haubek D, Poulsen K, Asikainen S, Kilian M. Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1995;33(2):395–401.
- Baehni PC, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Shenker BJ, Taichman NS. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch Oral Biol* 1981;26(8):671–6.
- Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008;371(9608):237–42.
- Yamano R, Ohara M, Nishikubo S, Fujiwara T, Kawamoto T, Ueno Y, et al. Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1391–8.
- Ahmed HJ, Svensson LA, Cope LD, Latimer JL, Hansen EJ, Ahlman K, et al. Prevalence of *cdtABC* genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *J Med Microbiol* 2001;50(10):860–4.
- Tan KS, Woo CH, Ong G, Song KP. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. *J Clin Periodontol* 2001;28(9):886–90.
- Contreras A, Rusitanonta T, Chen C, Wagner WG, Michalowicz BS, Slots J. Frequency of 530-bp deletion in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter region. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(5):338–40.
- Haubek D, Dirienzo JM, Tinoco EM, Westergaard J, Lopez NJ, Chung CP, et al. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Microbiol* 1997;35(12):3037–42.
- Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):79–84.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4(1):1–6.
- Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *J Periodontol Res* 1991;26(4):308–13.
- Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol* 1972;24(4):638–44.
- Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):509–13.

35. Brown LF, Beck JD, Rozier RG. Incidence of attachment loss in community-dwelling older adults. *J Periodontol* 1994;**65**(4):316–23.
36. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martin C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004;**31**(12):1061–9.
37. Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dellemijn-Kippuw N, Simon R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* 2000;**108**(5):383–92.
38. Preus HR, Anerud A, Boysen H, Dunford RG, Zambon JJ, Loe H. The natural history of periodontal disease. The correlation of selected microbiological parameters with disease severity in Sri Lankan tea workers. *J Clin Periodontol* 1995;**22**(9):674–8.
39. Ogunsalu C, Daisley H, Akpaka PE. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of pathogens isolated from patients with juvenile periodontitis in Jamaica: a prospective multi-centre study of 15 cases over a 15-year period. *West Indian Med J* 2011;**60**(2):235–9.
40. Stingu CS, Jentsch H, Eick S, Schaumann R, Knofler G, Rodloff A. Microbial profile of patients with periodontitis compared with healthy subjects. *Quintessence Int* 2012;**43**(2):e23–31.
41. Aberg CH, Kwamin F, Claesson R, Johansson A, Haubek D. Presence of JP2 and Non-JP2 genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and attachment loss in adolescents in Ghana. *J Periodontol* 2012;**83**(12):1520–8.
42. Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* 1997;**68**(7):651–66.
43. Papapanou PN, Teanpaisan R, Obiechina NS, Pithpornchaiyakul W, Pongpaisal S, Pisuthanakan S, et al. Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. *Eur J Oral Sci* 2002;**110**(5):345–52.
44. Chen C, Wang T, Chen W. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. *Mol Oral Microbiol* 2010;**25**(3):207–14.
45. Bandhaya P, Saraithong P, Likittanasombat K, Hengprasith B, Torrungruang K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes, the JP2 clone and cytolethal distending toxin genes in a Thai population. *J Clin Periodontol* 2012;**39**(6):519–25.
46. Roman-Torres CV, Aquino DR, Cortelli SC, Franco GC, Dos Santos JG, Corraini P, et al. Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Arch Oral Biol* 2010;**55**(3):242–8.
47. Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Romito GA, Aquino DR, Cortelli SC, et al. Subgingival microbial profiles as diagnostic markers of destructive periodontal diseases: a clinical epidemiology study. *Acta Odontol Scand* 2013;**71**(2):289–99.
48. Kim TS, Kang NW, Lee SB, Eickholz P, Pretzl B, Kim CK. Differences in subgingival microflora of Korean and German periodontal patients. *Arch Oral Biol* 2009;**54**(3):223–9.
49. Kim TS, Frank P, Eickholz P, Eick S, Kim CK. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *J Periodontol* 2009;**80**(12):2020–7.
50. Sakellari D, Katsikari A, Slini T, Ioannidis I, Konstantinidis A, Arsenakis M. Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *J Clin Periodontol* 2011;**38**(2):108–14.
51. Psoter WJ, Ge Y, Russell SL, Chen Z, Katz RV, Jean-Charles G, et al. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in dental plaque samples from Haitian adolescents. *Clin Oral Investig* 2011;**15**(4):461–9.
52. Jentsch H, Cachovan G, Guentsch A, Eickholz P, Pfister W, Eick S. Characterization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains in periodontitis patients in Germany. *Clin Oral Investig* 2012;**16**(6):1589–97.
53. Listgarten MA, Lai CH, Evian CI. Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. *J Clin Periodontol* 1981;**8**(3):155–64.
54. Dogan B, Saarela MH, Jousimies-Somer H, Alaluusua S, Asikainen S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype e – biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status. *Oral Microbiol Immunol* 1999;**14**(2):98–103.
55. Yoshida Y, Suzuki N, Nakano Y, Shibuya K, Ogawa Y, Koga T. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiol Immunol* 2003;**18**(3):135–9.
56. Teixeira RE, Mendes EN, Roque de Carvalho MA, Nicoli JR, Farias Lde M, Magalhaes PP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Can J Microbiol* 2006;**52**(3):182–8.
57. Ennibi OK, Benrachadi L, Bouziane A, Haubek D, Poulsen K. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in localized and generalized forms of aggressive periodontitis. *Acta Odontol Scand* 2012;**70**(4):318–22.
58. Haubek D, Poulsen K, Kilian M. Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 2007;**75**(6):3080–8.
59. Fabris AS, DiRienzo JM, Wikstrom M, Mayer MP. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol Immunol* 2002;**17**(4):231–8.
60. van der Reijden WA, Brunner J, Bosch-Tijhof CJ, van Trappen S, Rijnsburger MC, de Graaff MP, et al. Phylogenetic variation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype e reveals an aberrant distinct evolutionary stable lineage. *Infect Genet Evol* 2010;**10**(7):1124–31.

Artículo 2

Artículo 2:

Mínguez M, Ennibi OK, Pousa X, Lakhdar L, Abdellaoui L, Sánchez M, Sanz M, Herrera D (2016) Characterization of *A. actinomycetemcomitans* strains in subgingival samples from periodontitis subjects in Morocco. *Clinical Oral Investigations* 20(7): 1809-1818.

Caracterización de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en muestras de placa subgingival aisladas en pacientes con periodontitis en Marruecos.

Antecedentes y objetivos: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, especialmente su cepa altamente virulenta (clon JP2) representa un agente etiológico en la aparición y progresión de la periodontitis agresiva. Los objetivos de este trabajo son caracterizar la microbiota subgingival de pacientes con periodontitis en Marruecos y describir las características clínicas y microbiológicas de los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*, incluyendo la distribución de los serotipos, la variación en las secuencias de los genes de la leucotoxina y el operón de la toxina citolítica (*cdt*).

Material y métodos: Se tomaron muestras de placa subgingival en pacientes marroquíes con periodontitis que fueron analizadas mediante cultivo. De las muestras positivas para *A. actinomycetemcomitans*, entre 1 y 3 cepas fueron caracterizadas en términos de distribución de los serotipos, la variación en las secuencias de los genes de la leucotoxina y el operón del *cdt* mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Resultados: En el 35.6% de las muestras se hallaron cepas de *A. actinomycetemcomitans*. Estos pacientes mostraban bolsas periodontales más profundas ($p=0.035$) y mayores proporciones de *P. micra* ($p=0.045$) comparado con los pacientes que no presentaban *A. actinomycetemcomitans*. Las 40 muestras analizadas fueron serotipo “b”, en 16 pacientes hubo monoinfección por este serotipo. Cinco muestras, de 2 pacientes, presentaron la delección de 530 pares de bases en la región promotora del gen de la leucotoxina. 32 muestras (78% de las muestras) fueron positivas para la Cdt.

Conclusiones: La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* fue 35.6%. Todas las cepas analizadas correspondían al serotipo “b” y el 78% fueron Cdt positivas. El 12.2% de los pacientes mostró el clon JP2.

Characterization of *A. actinomycetemcomitans* strains in subgingival samples from periodontitis subjects in Morocco

M. Mínguez¹ · O. K. Ennibi² · X. Pousa¹ · L. Lakhdar² · L. Abdellaoui² · M. Sánchez³ · M. Sanz^{1,4} · D. Herrera^{1,4}

Received: 15 March 2015 / Accepted: 9 November 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Objective *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, specially its highly leucotoxic strain (JP2 clone), represents an etiological factor for the onset and progression of aggressive types of periodontitis. The aims of this investigation were to investigate the most relevant periodontal pathogens in the subgingival microbiota of periodontitis patients from Morocco and to describe the clinical and microbiological characteristics of subjects positive for *A. actinomycetemcomitans*, including serotype, leukotoxin gene, and operon of the cytolethal distending toxin (*cdt*) distribution.

Material and methods In consecutive Moroccan subjects diagnosed of periodontitis, subgingival samples were taken and processed by culture. From the positive samples for *A. actinomycetemcomitans*, one to three isolates were subcultured and characterized by means of polymerase chain reaction (PCR), assessing their specific serotype distribution, the variation in the sequences of the leukotoxin gene, and the operon of the *cdt*.

Results Twenty-one (35.6 %) out of 59 periodontitis patients harbored *A. actinomycetemcomitans*. These patients demonstrated statistically significant deeper pockets ($p = 0.035$) and

higher proportions of *P. micra* ($p = 0.045$) than did the negative group. The 39 studied isolates were serotype “b”; in 16 out of 17 patients, there was mono-colonization with this serotype. Five isolates, from two patients, presented the 530-bp deletion in the leukotoxin’s promoter region. Thirty-two isolates (78 % of the strains) were *cdt*-positive.

Conclusion *A. actinomycetemcomitans* was frequently found (35.6 %) in our sample. All strains were serotype “b,” and most (78 %) were also *cdt*-positive. The JP2 strain type was only detected in 12.2 % of the strains.

Clinical relevance *A. actinomycetemcomitans* can be frequently found in Morocco. This fact can influence the therapeutic approach of this type of patients.

Keywords *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* · Subgingival microbiota · Periodontitis · Morocco · Polymerase chain reaction

Introduction

Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused by bacteria present in the subgingival biofilm. This disease is characterized by loss of the connective tissue attachment and the supporting alveolar bone and if untreated can eventually progress to tooth loss. This biofilm consists of a complex structure of bacterial communities adhered to the tooth surface in a well-protected subgingival environment conferring the bacteria-specific resistance properties, pathogenic synergism, and reduced susceptibility to antibiotics that allows the overgrowth of pathogenic bacterial species [1].

From the more than 700 bacterial species detected in the biofilm, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythia* have been considered the most important pathogens, since they

✉ D. Herrera
davidher@odon.ucm.es

¹ Section of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Plaza Ramón y Cajal S/N, 28040 Madrid, Spain

² Clinical Department of Periodontology, Dental School, Mohammed V Souissi University, Rabat, Morocco

³ Laboratory of Research, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain

⁴ ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, University Complutense, Madrid, Spain

have shown a strong level of evidence in their association with periodontitis. [2] *A. actinomycetemcomitans* has been specifically implicated in the etiology of the aggressive forms of periodontitis, especially in populations of North and West African origin, where these aggressive forms of periodontitis are highly prevalent [3, 4].

This pathogen has evidenced a high degree of variability, both in terms of geographical prevalence and in the presence of virulence factors (serotype distribution and toxins, mainly leukotoxin and cytolethal distending toxin, Cdt), which has resulted in different patterns of disease association [3, 5]. *A. actinomycetemcomitans* has been characterized in six different clonal lineages representing the different serotypes (from “a” to “f”) and one untyped strain (serotype “g”) [6]. The distribution pattern of the serotypes has been associated with different diseases and with different patterns of colonization depending on the geographical region and patient’s ethnicity [7]. The most frequently detected serotypes are “a,” “b,” “c,” and “e,” while the serotypes “d” and “f” are rarely detected [8, 9].

One of the most studied virulence factors of *A. actinomycetemcomitans* is the secretion of a potent leukotoxin, which specifically destroys human polymorphonuclear leukocytes [10]. While most strains express relatively low levels of this leukotoxin, there are variations among the different isolates, and one specific hyperleukotoxic phenotype has been isolated and characterized by a 530-base pair deletion in the leukotoxin gene operon (*lxt*) encoding the toxin [10, 11]. The vast majority of strains of this highly leukotoxic clone, also known as the JP2 clone, have been isolated from subjects of African origin. In a population-based longitudinal study of 700 adolescents in Morocco, there was a direct etiological relationship between the presence of JP2 strains of *A. actinomycetemcomitans* and the initiation or progression of aggressive periodontitis [12]. This pathogen also produces a Cdt, which triggers DNA damage, mainly by its CdtB, the subunit that exhibits both type I deoxyribonuclease-like and phosphatase activities. Some specific classes of eukaryotic cells and cell lines, mainly oral epithelial cells and T lymphocytes, are susceptible to this toxin, resulting in the arrest of their cell cycle. Different studies have shown that not all *A. actinomycetemcomitans* strains present this cytotoxic activity [13].

In spite of this demonstrated strong association with the presence of *A. actinomycetemcomitans* and periodontitis in Morocco, there is only one study that has characterized the subgingival microbiota of a Moroccan population and has shown a clear association between disease severity and the most virulent clones (JP2-positive) of this pathogen [14]. There are, however, no studies assessing the microbiota and disease severity of patients negative for *A. actinomycetemcomitans* or the presence of other virulence factors in patients positive for *A. actinomycetemcomitans*. This investigation, therefore, was

aimed, firstly, to investigate the most relevant periodontal pathogens in the subgingival microbiota of periodontitis patients in Morocco, comparing those with and without *A. actinomycetemcomitans*, and, secondly, to assess in the isolated *A. actinomycetemcomitans* strains, the presence of virulence factors, the serotype distribution, the operon of the *cdt*, and the variation in the sequences of the genes that codify the leukotoxin.

Material and methods

Patients

Microbiological subgingival samples were collected from a convenience sample of consecutive patients diagnosed of periodontitis and seeking therapy at the Dental School in the Mohammed V, Souissi University, in Rabat. All included patients were Moroccan. All samples were taken from patients as part of their periodontal diagnostic process, and they were informed about the benefits of the microbiological diagnosis, an overview of the microbiological procedures, and that, eventually, some of the cultured colonies could be isolated for further processes, including definitive identification. Verbal informed consent was obtained from all individual participants included in the study. The study protocol was approved by The Biomedical Research Ethical Committee at the University Mohammed V Souissi of the Faculty of Medicine and Pharmacy of Rabat (reference number 400/2010).

Every selected patient satisfied the following criteria:

- 1. Being systemically healthy, without any acute pathology.
- 2. Having at least 16 teeth, at least three on every quadrant, to make possible the proposed microbiological sampling strategy.
- 3. Having at least one site with probing pocket depth (PPD) > 4 mm in each quadrant.

Subjects were excluded if pregnant or in lactation or when on any medication relevant for the study, such as intake of systemic antibiotics within the last 3 months.

These patients were clinically examined after taking a brief medical and smoking history. Using the criteria of the American Academy of Periodontology classification, each patient was diagnosed as chronic or aggressive periodontitis [15]. Since the criteria of rapid loss of attachment and the bone destruction were difficult to evaluate due to the lack of previous records in the present population, an estimation of rapid progression of the disease was made taking into account the actual destruction and the age of the patient. A separate group of patients was classified as “refractory” periodontitis,

including patients previously treated and demonstrating relapsing periodontitis, as defined in the inclusion criteria.

Four diseased sites were selected for microbiological sampling. In these selected sites, the presence of dental plaque (PII), bleeding on probing (BOP), suppuration, PPD, and recession was recorded by two trained investigators (XP and OE).

Microbiological sampling

Subgingival microbiological samples were taken from the deepest pocket in each quadrant [16]. At these sites, and once supragingival plaque was carefully removed with one sterile gauze to avoid bleeding and isolated with sterile cotton rolls and gentle air-drying, two consecutive sterile paper points (medium size, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) were inserted as deep as possible in the pocket and left in place for 10 s. The paper points were then transferred to a vial containing 1.5 mL of reduced transport fluid (RTF) and pooled with all the other paper points from the same patient [17]. Samples were transported for processing to the Laboratory of Microbiology at the Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain, within 24 h from the time of sampling.

Culture, isolation, and storage

Samples were homogenized by vortexing and were serially diluted in phosphate-buffered saline (PBS). Aliquots of 100 μ L were plated in two different media: blood agar medium (No. 2 of Oxoid; Oxoid Ltd, Basingstoke, England), with 5 % horse blood and haemin (5 mg/L) and menadione (1 mg/L), and Dentaid-1 medium [18].

The blood agar plates were studied after 7 and 14 days of anaerobic incubation (80 % N_2 ; 10 % H_2 ; 10 % CO_2 at 37 °C) and the specific pathogens *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *T. forsythia*, *Parvimonas micra*, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, and *Fusobacterium nucleatum* were identified based on the morphology of the colony. Colonies of each bacterial species were counted as the total number of colonies in a representative plate (between 30 to 300 colonies). The Dentaid-1 plates, used for selective isolation and growth of *A. actinomycetemcomitans*, were incubated at 37 °C in air with 5 % CO_2 and after 3–5 days were carefully examined for the identification of *A. actinomycetemcomitans*, based on its typical colony morphology, a positive catalase reaction, and a set of specific enzymes (RapID NH system Remel Inc., USA). From each patient positive for *A. actinomycetemcomitans*, and in order to evaluate the intra-individual variability, one to three strains were adequately isolated (up to 10 passes per strain) and stored at –80° until further use.

Isolation of genomic DNA

Cells were harvested by centrifugation and re-suspension in 1 mL of Tris–HCl 10 mM, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.8 mM (pH 8.0), and lysozyme (final concentration 5.0 mg/mL). After incubation at 37 °C for 30 min, proteinase K was added to a final concentration of 2 mg/ μ L, 1 mg/ μ L, and 1 % respectively. The mixture was incubated at 37 °C for 30 min. The DNA was then extracted with equal volumes of phenol (saturated with 10 mM Tris–HCl, pH 8.0) and phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25:24:1). Bulk nucleic acids were precipitated from the solution using ethanol followed by centrifugation (12,000 rpm) for 10 min. The DNA precipitate was re-suspended in 50 μ L of sterile distilled water. The result of the DNA extraction was assessed by electrophoresis. A 5- μ L aliquot of the extracted DNA was electrophoresed through a 1.0 % agarose gel, in a Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer [19]. The gel was stained with ethidium bromide (10 μ g/ml) and visualized under UV illumination, to confirm the identity of the species that were previously morphologically identified by culture.

Serotyping of strains

Serotypes “a” to “f” were determined by polymerase chain reaction (PCR) technique, based on specific sequences from the gene clusters responsible for the distinct serotypes described by Kaplan and coworkers, listed in Table 1 [20].

The PCR reaction was performed in a 25- μ L final volume containing 2.5 μ L of 10 \times PCR buffer, 1.0 μ L of 25 mM $MgCl_2$, 0.5 μ L of 10 mM deoxynucleoside triphosphates, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, CA, USA), 1.0 μ L of 25 μ M primers, and 2 μ L of genomic DNA. A 15- μ L aliquot of each PCR was electrophoresed through a 1.0 % agarose gel in 1 \times TAE buffer; the PCR products were visualized by staining with ethidium bromide (10 mg/mL) and visualized under UV illumination. The PCR assays were performed with an iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc). After the initial step of denaturation at 96 °C for 3 min, a total of 35 PCR cycles were performed; each cycle consisted of 30 s of denaturation at 95 °C, 1 min of annealing at 55 °C and 72 °C for 2 min, and a final step of extension at 72 °C for 10 min. Positive and negative controls were included.

Detection of putative leukotoxin overproducers

The deletion of 530 bp in the promoter region of the leukotoxin gene was determined in every isolate by means of PCR. The PCR primers and conditions for detecting the JP2 strain were those described by Haubek [21]. The PCR reaction was performed in a 25- μ L final volume containing 2.5 μ L of 10 \times PCR buffer, 1.0 μ L of 25 mM $MgCl_2$, 0.5 μ L of

Table 1 Primers described by Kaplan et al. (2002) selected for the PCR serotyping of *A. actinomycetemcomitans*

Primer	Sequence (5'-3')	Serotype	PCR product size(bp)
P11	TCTCCACCATTTTGAGTGG	b	333
P12	GAAACCACTTCTATTCTCC	c	268
P13	CCTTTATCAATCCAGACAGC	f	232
P15	TGGGTCATGGGAGGTACTCC	a	293
P16	GCTAGGAACAAAGCAGCATC		
P17	TGGAACGGGTATGGGAACGG	d	411
P18	GGATGCTCATCTAGCCATGC		
P19	ATTCCAGCCTTTTGGTTCTC	e	311
P20	TGGTCTGCGTTGTAGGTTGG		

bp base pair

10 mM deoxynucleoside triphosphates, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, CA, USA), 1.0 µL of 25 µM primers, and 2 µL of genomic DNA.

The PCR primer upstream from the deletion had the sequence 5'-CAGATCAAAACCTGATAACAGTATT-3' and the primer downstream from the deletion had the sequence 5'TTTCTCCATATTCCTCCTTCTGT-3'. The PCR temperature profile included an initial step of denaturation at 94 °C, a total of 30 cycles of denaturation for 1 min at 94 °C, annealing for 1 min at 60 °C, and a final step of extension at 72 °C for 2 min. The PCR fragment of 504 bp indicated deletion of 530 bp corresponding to the JP2 strain whereas a PCR fragment of 1034 bp indicated no deletion in the *A. actinomycetemcomitans* leukotoxin operon. Positive and negative controls (both previously tested in our laboratory) were included in the PCR assays. The molecular weights of the PCR products were determined by visualization and comparison with standard molecular weight markers using agarose gel electrophoresis.

cdt detection

The presence of the operon that codifies for the Cdt was also determined by means of PCR using the same procedure previously described for the leukotoxin but using the primers that amplify the complete operon CdtA1 and CdtC2, which are listed in Table 2. The total molecular weight of the amplified segment was of 2016 bp when the complete operon was present. The PCR products were also determined by visualization in 1.0 % agarose gel.

Statistical analysis

Patients were divided into positive or negative depending whether *A. actinomycetemcomitans* was detected. The clinical and microbiological findings were compared between these two groups by means of unpaired *t* test. Variables were first evaluated for normal distribution by assessing the skewness and kurtosis of the distribution, and microbiological variables

(proportions of microbiota and bacterial counts) were previously log-transformed. Frequencies of detection were compared using the chi-square test. The microbiological findings were also compared depending on the clinical diagnosis: chronic, aggressive, or refractory periodontitis patients.

In *A. actinomycetemcomitans*-positive patients, descriptive statistics, including frequency distribution, were used to characterize the samples in terms of the different serotypes and the variation of the sequences of the genes that codify the leukotoxin and the operon of the *cdt*. Contingency tables were constructed, and comparisons were performed using the chi-square test.

Results

A total of 59 periodontitis patients were included in the study and provided subgingival microbiological samples. Their mean age was 27.6 years (range 12–55), and the percentage of females was 66.1 %. Most patients were non-smokers (Table 3).

Complete demographic and clinical data were available from 45 patients; correlations between clinical and microbiological variables were done only for those patients with complete data available, while 59 samples were only considered for the assessment of microbiological profiles.

From the 45 patients with complete clinical and demographic data, 12 were diagnosed of chronic periodontitis (20.34 %), 32 (54.24 %) of aggressive periodontitis, and one (1.7 %) as refractory periodontitis. The clinical data of this population is depicted in Table 4, with a mean PPD of 6.2 mm, a mean recession of 0.85 mm, and mean percentages of BOP, plaque index (PII), and suppuration of 82, 78, and 21 %, respectively.

Tables 5, 6, and 7 show the microbiological results. The mean bacterial total count (expressed as total colony forming units [CFU], per milliliter) for the 59 samples was 1.6×10^7 . Twenty-one of them (35.6 %) were positive for *A. actinomycetemcomitans*, with a mean count of 6.5×10^3

Table 2 Primers used for the detection of the presence of the *cdt* operon of *A. actinomycetemcomitans* (designed in this study)

Primer	Sequence (5'–3')	Gen	PCR product size (bp)
CdtA ₁	ATGAAGAAGTTTTACCTGGTC	CdtA	669
CdtA ₂	TAATTAAGGGGTCAAGCTTCT		
CdtB ₁	TGCAATCCCATTTTCGAATTA	CdtB	851
CdtB ₂	TTAGCGATCACGAACAAAAC		
CdtC ₁	CTTTAGGTACATGTATTGAA	CdtC	560
CdtC ₂	TTAGCTACCCTGATTTC		

and a mean proportion of the total microbiota of 0.1 %. The mean detection of the other pathogens was higher, including *P. gingivalis* (84.7 %), *F. nucleatum* (98.3 %), and *P. intermedia* (94.9 %), representing the mean proportions of these species between the 10 and the 20 % of the total bacteria counts in both the *A. actinomycetemcomitans*-positive and *A. actinomycetemcomitans*-negative patient group, except for *F. nucleatum* in the first group, where the proportion was 2.2 % (Table 6). The frequency of detection of these species was high in both groups, where the values were 90.48 and 81.58 % for *P. gingivalis* and 100 and 97.37 % for *F. nucleatum*, while the frequency values for *P. intermedia* were 85.71 and 100 %, respectively (Table 7).

Characterization of *A. actinomycetemcomitans*-positive patients

The 21 patients positive for *A. actinomycetemcomitans* had a mean age of 26.6 years (ranging between 13 and 46). Their mean PPD was 6.96 mm and the recession 0.76 mm. The mean values for BOP, PII, and suppuration were 79 %, 75 %, and 20 %, respectively (Table 4).

The mean total bacterial count was 1.8×10^7 , the mean count of *A. actinomycetemcomitans* was 1.8×10^4 , and the mean proportion was 0.3 % (Tables 5 and 6). Patients positive for *A. actinomycetemcomitans* presented frequently *F. nucleatum* (100 %) or *P. gingivalis* (90.4 %) (Table 7).

The comparison between the 38 *A. actinomycetemcomitans*-negative and the 21 *A. actinomycetemcomitans*-positive patients revealed statistically significant differences in terms of higher mean counts of *P. micra* ($p=0.045$) and deeper mean PPD ($p=0.035$), in the *A. actinomycetemcomitans*-positive group. No other statistically significant differences were detected, and very similar levels of BOP, PII, and SUP were observed. In addition, more mean recession was measured in the *A. actinomycetemcomitans*-negative group.

From the 21 *A. actinomycetemcomitans*-positive patients, 41 strains were characterized in 17 patients: except one patient, all provided 2 or 3 strains. Most of the patients (88.2 %) had the leukotoxin gene (ltx 1034), while only two patients (11.8 %) had the JP2 clone (Table 8). These two patients were women suffering from aggressive periodontitis. Samples from

one of the patients were positive for *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, and *F. nucleatum*, and others were positive for *P. micra*. The bacterial total counts ranged between 10^6 and 10^7 and the mean PPD between 7.75 and 8 mm, deeper than the mean PPD for the *A. actinomycetemcomitans*-positive patients group (6.96 mm).

Of the patients, 64.7 % were characterized as *cdt* gene-positive. All patients, except one, were characterized as “b” serotype. This particular patient was characterized by “a” and “e” serotypes (Table 8).

From the 41 strains, only five (12.2 %) were defined as JP2 clone, while 36 were characterized as ltx 1034. *cdt*-positive gene predominated (78 %) over *cdt*-negative gene (22 %). All the strains, except two, were serotype “b” (95.1 %), while these two were “a” and “e” (Table 8).

Regarding the genetic distribution of the *A. actinomycetemcomitans* strains, every JP2 clone strain ($n=5$) was serotype b and *cdt*-positive; 27 out of 36 (75 %) of the ltx 1034 strains were *cdt*-positive; and only two strains were serotype “a” and “e,” both *cdt*-negative and ltx 1034 (Table 9).

Discussion

In this population of Moroccan patients with periodontitis, the presence of *A. actinomycetemcomitans* was a relatively frequent finding (35.6 %), and the clinical condition of those harboring *A. actinomycetemcomitans* was significantly worse (deeper pockets, $p=0.035$) and with a more pathogenic microbiota (higher proportions of *P. micra*, $p=0.045$) when compared with those patients negative for *A. actinomycetemcomitans*. The recovered strains of this pathogen were very homogeneous, belonging almost exclusively to serotype “b,” with the genes responsible for the codification of leukotoxin found in every strain (and five, 12.2 %, belonging to the JP2 strain type) and the operon that codifies the *cdt* detected in 78 % of the strains.

The reported figure of prevalence of *A. actinomycetemcomitans* (35.6 %) should be interpreted with caution, since the aim and the design of this study were not to assess prevalence. However, in this population in Morocco with 61.9 % cases of aggressive periodontitis and 14.29 % of chronic periodontitis, the prevalence may be considered as

Table 3 Demographic data, periodontal status, and patient characteristics for the whole sample and for each compared group (according to the detection of *A. actinomycetemcomitans* [*Aa*])

PERIODONTITIS	All	<i>Aa</i> -positive	<i>Aa</i> -negative
<i>n</i>	59	21	38
Chronic	12	3	9
Aggressive	32	13	19
Refractory	1	1	0
Not available	14	4	10
% Chronic	20.34 %	14.29 %	23.68 %
% Aggressive	54.24 %	61.90 %	50.00 %
% Refractory	1.69 %	4.76 %	0.00 %
% Not available	23.73 %	19.05 %	26.32 %
SMOKING	all	<i>Aa</i> -positive	<i>Aa</i> -negative
<i>n</i>	59	21	38
Non-smoker	45	18	27
Smoker	1	0	1
Not available	13	3	10
Non-smoker	76.27 %	85.71 %	71.05 %
Smoker	1.69 %	0.00 %	2.63 %
Not available	22.03 %	14.29 %	26.32 %
GENDER	all	<i>Aa</i> -positive	<i>Aa</i> -negative
<i>n</i>	59	21	38
Male	6	0	6
Female	39	18	21
Not available	14	3	11
% Male	10.17 %	0.00 %	15.79 %
% Female	66.10 %	85.71 %	55.26 %
% Not available	23.73 %	14.29 %	28.95 %
AGE	All	<i>Aa</i> -positive	<i>Aa</i> -negative
Mean	27.6	26.6	28.2
Standard deviation	9.2	8.3	9.8
Maximum	55	46	55
Minimum	12	13	12
<i>n</i>	45	17	28

relatively low, when comparing with other studies assessing similar populations. In a cross-sectional study, Haubek and coworkers, using microbial culturing, found 60.4 % of *A. actinomycetemcomitans* in a group of Moroccan adolescents [22]. The use of PCR-based microbial diagnosis has provided very heterogeneous results with frequencies of detection of 13 and 37.5 % in severe chronic and aggressive periodontitis patients, respectively [14]. Similarly, in an aggressive periodontitis patient group younger than 35 years, the reported prevalence was 83 % [22]. There may be different explanations for these variable findings, including the use of different methods of detection, diversity in demographic characteristics (especially age), and differences in periodontal status, although all studies coincide that *A. actinomycetemcomitans* was a key factor in the onset and progression, especially in aggressive periodontitis [2,

Table 4 Clinical characteristics, expressed as mean and standard deviation (SD) of patients in each group

Clinical data	All			<i>Aa</i> -positive			<i>Aa</i> -negative		
	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD
PPD	45	6.20	1.90	17	6.96	2.08	28	5.74	1.65
REC	45	0.85	1.02	17	0.76	0.85	28	0.90	1.12
BOP	45	0.82	0.29	17	0.79	0.28	28	0.84	0.29
PI	45	0.78	0.34	17	0.75	0.36	28	0.79	0.33
SUP	40	0.21	0.20	14	0.20	0.20	26	0.21	0.20

Aa *A. actinomycetemcomitans*, *PPD* probing pocket depth (in mm), *REC* recession (in mm), *CAL* clinical attachment level (in mm), *BOP* bleeding on probing (in percentage), *PI* plaque index (in percentage), *SUP* sup-puration (in percentage)

23]. The fact that in our sample the mean age is 27.6 years, including 20.34 % of the patients suffering from chronic periodontitis, is due, on one hand, to the convenience nature of the sample that consisted of consecutive patients seeking treatment at that dental school and, on the other hand, to the high prevalence of periodontitis in young people in Morocco, as it has been described by several authors [14, 22].

In other geographical locations, the reported presence of *A. actinomycetemcomitans* in periodontitis patients has shown wide variability, mainly depending on the used microbial technologies [24]. In a previous study from our group, using the same technology, the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* in a Spanish population was 5.7 % [25]. In Ghana, the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* in aggressive periodontitis adolescents was 54.4 %, while in Sudan, also in aggressive periodontitis, the prevalence was 70.3 % [26, 27]. Whether these important differences are due to the methodologies used, the different geographical location, or the fact that they represent a specific microbiological profile directly related with the onset of progression of periodontitis remains unclear. It is important to take into account that the presence of *A. actinomycetemcomitans* is not just determined by genetics but also by several factors influencing the appropriate environment for the growth of *A. actinomycetemcomitans* [20].

The fact that deeper PPD with a more complex microbiota (higher counts of *P. micra*) was reported in those patients positive for *A. actinomycetemcomitans* is congruent with results from other studies associating the presence of *A. actinomycetemcomitans* with a greater extension and severity of periodontitis or even directly related with the specific diagnosis of aggressive periodontitis [26, 27].

This study has also shown that almost every isolate of *A. actinomycetemcomitans* corresponded to serotype “b.” Only one patient harbored two different serotypes, namely “a” and “e.” Finding a patient harboring more than one serotype is not so unusual, as reported in other investigations assessing patients of different ethnic origins [28, 29]. Also in Morocco,

Table 5 Microbiological data: bacterial counts (transformed to log₁₀ cfu) in the compared groups, expressed as mean and standard deviation (SD) of the colony-forming units/milliliter

Bacterial counts	All			Aa-positive			Aa-negative		
	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD
Total	59	16,902,734	15,651,442	21	18,604,771	13,651,066	38	15,962,135	16,754,697
<i>A.a</i>	59	6584	15,158	21	18,499	20,854	38	0	0
<i>P. gingivalis</i>	59	3,458,713	8,181,444	21	3,943,280	5,545,568	38	3,190,926	9,385,969
<i>P. intermedia</i>	59	3,317,138	6,731,681	21	4,900,469	9,389,824	38	2,442,139	4,600,780
<i>T. forsythia</i>	59	340,515	1,009,729	21	657,171	1,594,209	38	165,521	368,877
<i>P. micra</i>	59	106,047	364,589	21	233,514	587,216	38	35,605	87,526
<i>C. rectus</i>	59	21,277	61,810	21	3143	14,402	38	31,298	74,745
<i>F. nucleatum</i>	59	321,051	371,254	21	266,514	273,351	38	351,189	415,989
<i>Eubacterium</i>	59	671	5155	21	0	0	38	1042	6424
<i>Capnocytop.</i>	59	6063	18,753	21	8234	23,117	38	4863	16,071
<i>E. corrodens</i>	59	36,020	88,262	21	45,257	121,882	38	30,916	64,083

A. a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* *Porphyromonas gingivalis*, *P. intermedia* *Prevotella intermedia*, *T. forsythia* *Tannerella forsythia*, *P. micra* *Parvimonas micra*, *C. rectus* *Campylobacter rectus*, *F. nucleatum* *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium* *Eubacterium* spp., *Capnocytop* *Capnocytophaga* spp., *E. corrodens* *Eikenella corrodens*

a study by Haubek et al. reported that most of aggressive periodontitis patients (77 %) were positive for serotype “a,” 11 % for serotype “c,” and 5.5 % for serotype “d,” which is in contrast with our results, although in their study a serotype-specific antiserum was used, instead of molecular techniques [22].

Using the same methodology, our group evaluated a population of periodontitis patients in Spain, and subjects positive for *A. actinomycetemcomitans* were infected by multiple different serotypes, including “a,” “b,” or “c” [25]. These results are clearly in contrast with the pattern distribution of the results of the present study, in a Moroccan periodontitis population, characterized by mono-colonization and “b” being the

clearly predominant serotype. There is convincing evidence of differences in serotype distribution related to geography and/or ethnic groups; however, whether there is an association between the serotype distribution and the clinical periodontal status is still unknown. In USA, serotype “b” strains were frequently isolated from patients with localized juvenile periodontitis, while another study in the same geographical location found a clear predominance of serotype “c” [3, 30, 31]. Similarly, serotype “c” was found as the predominant serotype in diseased sites in some Asian countries and in some African populations as Ghanaian [29, 32–34].

The virulence of *A. actinomycetemcomitans* strains has also been attributed to the presence of the leukotoxin gene and

Table 6 Microbiological data: proportions of total microbiota, expressed as mean and standard deviation (SD)

Proportions	All			Aa-positive			Aa-negative		
	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD
<i>A. actinomyc.</i>	59	0.1 %	0.4 %	21	0.3 %	0.6 %	38	0.0 %	0.0 %
<i>P. gingivalis</i>	59	15.3 %	17.7 %	21	17.8 %	18.0 %	38	13.9 %	17.6 %
<i>P. intermedia</i>	59	12.7 %	17.2 %	21	15.7 %	22.5 %	38	11.0 %	13.5 %
<i>T. forsythia</i>	59	2.6 %	7.5 %	21	2.5 %	5.4 %	38	2.7 %	8.5 %
<i>P. micra</i>	59	0.8 %	2.1 %	21	1.2 %	2.5 %	38	0.5 %	1.7 %
<i>C. rectus</i>	59	0.2 %	0.8 %	21	0.0 %	0.2 %	38	0.3 %	0.9 %
<i>F. nucleatum</i>	59	3.8 %	8.8 %	21	2.2 %	3.2 %	38	4.7 %	10.6 %
<i>Eubacterium</i>	59	0.0 %	0.1 %	21	0.0 %	0.0 %	38	0.0 %	0.2 %
<i>Capnocytophaga</i>	59	0.1 %	0.3 %	21	0.1 %	0.3 %	38	0.1 %	0.2 %
<i>E. corrodens</i>	59	0.3 %	1.0 %	21	0.4 %	1.4 %	38	0.3 %	0.6 %

Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *A. actinomyc* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* *Porphyromonas gingivalis*, *P. intermedia* *Prevotella intermedia*, *T. forsythia* *Tannerella forsythia*, *P. micra* *Parvimonas micra*, *C. rectus* *Campylobacter rectus*, *F. nucleatum* *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium* *Eubacterium* spp., *Capnocytophaga* *Capnocytophaga* spp., *E. corrodens* *Eikenella corrodens*

Table 7 Microbiological data: number of positive samples (n-positive) and frequency of detection of different species

Frequency	All			Aa-positive			Aa-negative		
	n	n-positive	Frequency	n	n-positive	Frequency	n	n-positive	Frequency
<i>A. actinomyc.</i>	59	21	35.59 %	21	21	100.00 %	38	0	0.00 %
<i>P. gingivalis</i>	59	50	84.75 %	21	19	90.48 %	38	31	81.58 %
<i>P. intermedia</i>	59	56	94.92 %	21	18	85.71 %	38	38	100.00 %
<i>T. forsythia</i>	59	24	40.68 %	21	9	42.86 %	38	15	39.47 %
<i>P. micra</i>	59	15	25.42 %	21	7	33.33 %	38	8	21.05 %
<i>C. rectus</i>	59	10	16.95 %	21	1	4.76 %	38	9	23.68 %
<i>F. nucleatum</i>	59	58	98.31 %	21	21	100.00 %	38	37	97.37 %
<i>Eubacterium</i>	59	1	1.69 %	21	0	0.00 %	38	1	2.63 %
<i>Capnocytophaga</i>	59	8	13.56 %	21	4	19.05 %	38	4	10.53 %
<i>E. corrodens</i>	59	18	30.51 %	21	6	28.57 %	38	12	31.58 %

Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *A. actinomyc* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* *Porphyromonas gingivalis*, *P. intermedia* *Prevotella intermedia*, *T. forsythia* *Tannerella forsythia*, *P. micra* *Parvimonas micra*, *C. rectus* *Campylobacter rectus*, *F. nucleatum* *Fusobacterium nucleatum*, *E. corrodens* *Eikenella corrodens*

mainly to the presence of the serotype “b” JP2 clone. In the present study, this clone was detected in five isolates from two patients (11.8 %). In a large school children cohort, this highly leukotoxic strain was detected in 14.5 % of the cases, using the same primers as in this study [22]. Ennibi and coworkers found a prevalence of 77 % of the JP2 clone among a group of aggressive periodontitis, young adult patients in Morocco, using a different set of primers, while in Ghana, the prevalence

of the JP2 clone was 8.8 % [26, 35, 36]. The prevalence reported in the present study was lower than expected, since it is well known that this clone affects more likely to subjects of African origin [36–38]. One explanation to this discrepancy may be the use of culture as the first detection method, which due to its inherent low sensitivity may have underestimated the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* and consequently the prevalence of high leukotoxic strains, in comparison with the other studies using PCR as the first detection method.

The *cdt* gene was detected in 32 out of the 41 strains of periodontitis patients (78 %). The reported prevalence of this toxin in *A. actinomycetemcomitans* is highly variable. In a PCR-based disease progression study, a similar prevalence was described in a Ghanaian adolescent population (79 %), although in this study there was no relation between the *cdt* genotype and the disease progression nor with the Cdt activity [34]. Ahmed and coworkers found 43 of 50 strains from periodontitis patients containing all three *cdt* genes and expressing Cdt activity [39]. In another PCR-based study, however, only 13 out of 106 diseased sites were positive for these genes, while Fabris et al. reported its presence in 39 out of the 40 patients studied [40, 41].

Table 8 Patient and strain based analysis: leukotoxin, CDT, and serotype distribution

Strains	Patients	Percent		
1	1	5.9		
2	8	47.05		
3	8	47.05		
Total	17			
			Patients	Strains
Leukotoxin	n	%	n	%
ltx 1034	15	88.2	36	87.8
JP2	2	11.8	5	12.2
Both	0	0.00	0	0.00
Total	17		41	
CDT	n	%	n	%
CDT +	11	64.7	32	78
CDT -	3	17.6	9	22
Both	3	17.6	0	0.00
Total	17		41	
Serotype	n	%	n	%
b	16	94.1	39	95.1
a & e	1	5.9	2	4.9
Other	0	0.00	0	0.00
Total	17		41	

Table 9 Strain based analysis: genetic distribution of the *A. actinomycetemcomitans* samples

Serotype	Leukotoxin				Total
	JP2		ltx 1034		
	<i>cdt</i> +	<i>cdt</i> −	<i>cdt</i> +	<i>cdt</i> −	
a and e	0	0	0	2	2
b	5	0	27	7	39
Total	5	0	27	9	41

It is important to acknowledge the limitations of the present investigation. First, we did not use uniform criteria in the clinical diagnosis. In addition, in one patient, only one strain could be studied, which made it impossible to assess the presence of different serotypes in this subject. Moreover, the primer for the serotype “e” described by van der Reijden was not used (it was described after our samples were analyzed); therefore, it is possible that these so called non-typable strains could belong to that serotype [42]. The small size of this convenience sample and the lack of clinical and demographic data of 14 subjects (who were clinically assessed and diagnosed as periodontitis, but the data files were lost) should be recognized as other limitations of this investigation. The convenience nature of the sample is a common limitation found in other studies with a similar methodology, as Ennibi and coworkers in Morocco, or Sakellari and coworkers in Greece, also recruited patients from the Periodontology Department of the University in order to study the microbiological profiles of a particular group of the population [35, 38].

In conclusion, this research has evidenced that the presence of *A. actinomycetemcomitans* was a relatively frequent finding (35.6 %) in patients with periodontitis in Morocco. The isolated strains were mostly from serotype “b.” Most of these strains were positive for the operon that codifies the *cdt* (78 %) and for the genes responsible for the codification of leukotoxin (87.8 %), although only five (12.2 %) of the isolates belonged to the JP2 highly leukotoxic strain.

Acknowledgments We thank Arancha Llama-Palacios, María José Marín, Itziar González and Ana O’Connor from the Laboratory of Dental Research, University Complutense, Madrid, for their technical assistance.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Listgarten MA (1976) Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 47:1–18
- Consensus report (1996) Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1:926–932
- Asikainen S, Chen C, Slots J (1995) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol* 10:65–68
- Poulsen K, Theilade E, Lally ET, Demuth DR, Kilian M (1994) Population structure of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a framework for studies of disease-associated properties. *Microbiology* 140:2049–2060
- Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S (2000) Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *J Clin Microbiol* 38:79–84
- Kanasi E, Dogan B, Karched M, Thay B, Oscarsson J, Asikainen S (2010) Lack of serotype antigen in *A. actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 89:292–296
- Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Roman-Torres CV, Franco GC, Gomez RS et al (2012) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 1311–1318
- Holtta P, Alaluusua S, Saarela M, Asikainen S (1994) Isolation frequency and serotype distribution of *mutans streptococci* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand J Dent Res* 102: 113–119
- Celenligil H, Ebersole JL (1998) Analysis of serum antibody responses to periodontopathogens in early-onset periodontitis patients from different geographical locations. *J Clin Periodontol* 25:994–1002
- Baehni PC, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Shenker BJ, Taichman NS (1981) Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch Oral Biol* 26:671–676
- Zambon JJ, Christersson LA, Slots J (1983) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* 54:707–711
- Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 371:237–242
- Yamano R, Ohara M, Nishikubo S, Fujiwara T, Kawamoto T, Ueno Y et al (2003) Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria. *J Clin Microbiol* 41:1391–1398
- Benrachadi L, Bouziane A, Azziman Z, Bouziane-Quartini F, Ennibi O (2012) Screening for periodontopathogenic bacteria in severe chronic periodontitis in a Moroccan population. *Med Mal Infect* 42:599–602
- Armitage GC (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4:1–6
- Mombelli A, McNabb H, Lang NP (1991) Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *J Periodontol Res* 2:308–313
- Syed SA, Loesche WJ (1972) Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol* 24:638–644
- Alsina M, Olle E, Frias J (2001) Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 39:509–513
- Yorgancioglu A, Turktas H, Kalayci O, Yardim N, Buzgan T, Kocbas A et al (2009) The WHO global alliance against chronic respiratory diseases in Turkey (GARD Turkey). *Tuberk Toraks* 57: 439–452
- Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D, Fine DH (2002) Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol* 40:1181–1187
- Haubek D, Dirienzo JM, Tinoco EM, Westergaard J, Lopez NJ, Chung CP et al (1997) Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Microbiol* 35:3037–3042
- Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M (2001) Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 80:1580–1583

23. Van der Velden U, Abbas F, Armand S, Loos BG, Timmerman MF, Van der Weijden GA et al (2006) Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol* 33:540–548
24. Stingu CS, Jentsch H, Eick S, Schaumann R, Knofler G, Rodloff A (2012) Microbial profile of patients with periodontitis compared with healthy subjects. *Quintessence Int* 43:23–31
25. Minguéz M, Pousa X, Herrera D, Blasi A, Sanchez MC, Leon R et al (2014) Characterization and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from a population of periodontitis patients in Spain. *Arch Oral Biol* 59:1359–1367
26. Aberg CH, Kwamin F, Claesson R, Johansson A, Haubek D (2012) Presence of JP2 and Non-JP2 Genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and attachment loss in adolescents in Ghana. *J Periodontol* 83:1520–1528
27. Elamin A, Albandar JM, Poulsen K, Ali RW, Bakken V (2011) Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Sudanese patients with aggressive periodontitis: a case–control study. *J Periodontol Res* 46:285–291
28. Aberg CH, Sjodin B, Lakio L, Pussinen PJ, Johansson A, Claesson R (2009) Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in young individuals: a 16-year clinical and microbiological follow-up study. *J Clin Periodontol* 36:815–822
29. Yoshida Y, Suzuki N, Nakano Y, Shibuya K, Ogawa Y, Koga T (2003) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiol Immunol* 18:135–139
30. Chen C, Wang T, Chen W (2010) Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. *Mol Oral Microbiol* 25:207–214
31. Zambon JJ, Slots J, Genco RJ (1983) Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun* 41:19–27
32. Chung HJ, Chung CP, Son SH, Nisengard RJ (1989) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 60:506–511
33. Mombelli A, Gmur R, Lang NP, Corbert E, Frey J (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. *J Clin Periodontol* 26:505–510
34. Hoglund Aberg C, Antonoglou G, Haubek D, Kwamin F, Claesson R, Johansson A (2013) Cytolethal distending toxin in isolates of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* from Ghanaian adolescents and association with serotype and disease progression. *PLoS One* 8:65781
35. Ennibi OK, Benrachadi L, Bouziane A, Haubek D, Poulsen K (2012) The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in localized and generalized forms of aggressive periodontitis. *Acta Odontol Scand* 70:318–322
36. Poulsen K, Ennibi OK, Haubek D (2003) Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 41:4829–4832
37. Haubek D, Poulsen K, Asikainen S, Kilian M (1995) Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 33:395–401
38. Sakellari D, Katsikari A, Slini T, Ioannidis I, Konstantinidis A, Arsenakis M (2011) Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *J Clin Periodontol* 38:108–114
39. Ahmed HJ, Svensson LA, Cope LD, Latimer JL, Hansen EJ, Ahlman K et al (2001) Prevalence of *cdtABC* genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *J Med Microbiol* 50:860–864
40. Tan KS, Woo CH, Ong G, Song KP (2001) Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. *J Clin Periodontol* 28:886–890
41. Fabris AS, DiRienzo JM, Wikstrom M, Mayer MP (2002) Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol Immunol* 17:231–238
42. van der Reijden WA, Brunner J, Bosch-Tijhof CJ, van Trappen S, Rijnsburger MC, de Graaff MP et al (2010) Phylogenetic variation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype e reveals an aberrant distinct evolutionary stable lineage. *Infect Genet Evol* 10:1124–1131

Artículo 3

Artículo 3:

Chahboun H, Mínguez M, Herrera D, Sanz M, Ennibi OK (2015) Bacterial profile of aggressive periodontitis in Morocco: a cross-sectional study. *BMC Oral Health* 24: 15-25.

Perfiles microbiológicos subgingivales de la periodontitis agresiva en Marruecos: un estudio transversal.

Antecedentes y objetivos: La periodontitis agresiva es una de las formas más destructivas de las enfermedades periodontales. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* parece tener papel etiológico importante en la etiología de la periodontitis agresiva, sin embargo la evidencia es escasa respecto a la implicación de otros patógenos periodontales en esta entidad clínica. El objetivo de este estudio fue analizar la composición de la microbiota subgingival de pacientes marroquíes con periodontitis agresiva.

Material y métodos: Se recogieron muestras de placa subgingival de 50 pacientes con periodontitis agresiva (13 localizada y 37 generalizada) y 20 muestras de pacientes con periodontitis crónica. Las muestras se tomaron de las 4 bolsas periodontales más profundas de cada paciente, y se analizaron conjuntamente mediante cultivo.

Resultados: *A. actinomycetemcomitans* se halló más frecuentemente en periodontitis agresiva generalizada que en periodontitis crónica ($p=0.004$), y *Porphyromonas gingivalis* se aisló con menos frecuencia en periodontitis agresiva localizada respecto a la periodontitis agresiva generalizada ($p=0.040$) o crónica ($p=0.016$). *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Tannerella forsythia* se detectaron en todos los grupos. Las proporciones medias de *A. actinomycetemcomitans* fueron mayores en periodontitis agresiva comparado con crónica. Los pacientes con periodontitis agresiva generalizada albergaban mayores proporciones de *P. gingivalis* y *T. forsythia*, comparado con los casos de periodontitis agresiva localizada o periodontitis crónica.

Conclusiones: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* se hallaron frecuentemente en las muestras de pacientes con periodontitis agresiva.

Las diferencias en las frecuencias de detección, recuentos y proporciones de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* sugieren la caracterización microbiológica distinta de la periodontitis agresiva, localizada y generalizada y de la periodontitis crónica en Marruecos.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Bacterial profile of aggressive periodontitis in Morocco: a cross-sectional study

Hanane Chahboun^{1†}, Maria Minguez Arnau², David Herrera², Mariano Sanz² and Oum Keltoum Ennibi^{1*†}

Abstract

Background: Aggressive periodontitis (AgP) is one of the most severe forms of periodontal diseases. In Morocco, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* has been strongly associated with AgP, however limited knowledge is available about the implication of other periodontal pathogens in this entity. Therefore, the main aim of this study was to evaluate the composition of the subgingival microbiota in Moroccan patients with AgP.

Methods: Subgingival plaque samples were collected from 50 aggressive, 13 localized and 37 generalized periodontitis patients. Samples from 20 chronic periodontitis (ChP) patients were taken as controls. Samples collected from the four deepest periodontal pockets in each patient were pooled in pre-reduced transport fluid and examined by culture.

Results: *A. actinomycetemcomitans* was significantly more frequent ($p = 0.004$) in generalised AgP compared to ChP, and *Porphyromonas gingivalis* was less prevalent in localized AgP, when compared with generalized AgP ($p = 0.040$) or ChP ($p = 0.016$). *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Tannerella forsythia* were also frequently detected in all groups. Mean proportions of *A. actinomycetemcomitans* were significantly higher in AgP groups, when compared to ChP, and generalized AgP patients harbored significantly higher proportions of *P. gingivalis* and *T. forsythia*, when compared to localized AgP or ChP.

Conclusions: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* and *F. nucleatum* were frequently detected in this Moroccan population with AgP. Differences in frequency of detection, counts and proportions of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* suggests the presence of distinct microbiological profiles for localized AgP, generalized AgP and ChP patients.

Keywords: Periodontal pathogens, Aggressive periodontitis, Chronic periodontitis, Subgingival microbiota, *A. actinomycetemcomitans*

Background

Aggressive periodontitis (AgP) is a form of periodontitis characterized by rapid and severe periodontal destruction in otherwise young healthy individuals. The etiology of periodontitis is very complex including the dental biofilm, which triggers the immuno-inflammatory response in a susceptible host. This interaction leads to the destruction of the periodontal tissues [1,2]. Pathogenic bacteria are the primary etiology agents in the pathogenesis of periodontitis. The oral biofilm is very complex and count for over 700 species, however only some

micro-organisms have been specifically associated with periodontal diseases [3]. The majority of periodontal pathogens are Gram-negative and strict anaerobe, acting in synergy. Among the most important species, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* has been frequently associated with AgP [4,5]. Other bacteria are known as been associated with progression of periodontal destruction, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* and *Parvimonas micra* [6]. All these bacterial species produce a wide variety of virulent factors enabling them to colonize subgingival sites, to resist the defense mechanisms of the host and to cause periodontal tissue destruction [7].

* Correspondence: o.ennibi@um5s.net.ma

†Equal contributors

¹EREB (Research Group of Oral Ecosystem), Faculty of Medicine Dentistry, Mohammed V University, Rabat, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article

These micro-organisms do not suffice to advance the disease. Indeed, the host immune response modules the evolution of the disease toward destruction or cure [8]. The role of these bacteria in the pathogenesis of the human periodontitis is based on their high frequency of isolation, the ability to adhere to epithelial cells, the ability to produce numerous virulent factors like the extracellular matrix proteins, protease, collagenase, endotoxin (LPS), bacteriocins, hemotactic inhibitors, leucotoxins, cytotoxins, toxic metabolic substances (H_2S , putricines), immunosuppressive proteins, etc. [9,10].

Whereas *A. actinomycetemcomitans* is widely associated with localized AgP [7,11], *P. gingivalis* is regarded as the major causative agent in chronic periodontitis (ChP) [12]. Recently, a very strong association between the presence of the JP2 clone of *A. actinomycetemcomitans* and AgP was demonstrated among adolescents in Morocco [13]. In addition, a prospective longitudinal study has shown that infection with the JP2 clone is likely to be important in the initiation of the disease [14]. However, other periodontopathic bacteria, such as *P. gingivalis* are also suspected of participating in AgP [15]. It is admitted that AgP is not a mono-infectious disease, and the bacterial profile of this entity has not been studied in depth in Morocco. Thus, identification of the most prevalent bacteria is necessary to understand the bacterial etiology and could help to understand the treatment failure in some cases.

The aim of this study was to characterize the subgingival microbiota in a Moroccan population with AgP, including the evaluation of the presence and quantification, by means of culturing, of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *P. intermedia/nigrescens*, *T. forsythia*, *E. corrodens*, *P. micra*, *Eubacterium* spp., and *Capnocytophaga* spp.

Methods

Study population

This cross-sectional study was performed with a convenience sample of consecutive patients seeking treatment at the clinical department of Periodontology at the Faculty of Dentistry of Mohammed V Souissi University, Rabat, Morocco (from January 2011 to December 2012).

All subjects were verbally informed about the investigation, and they were asked to sign informed consent. The study was approved by the Medical Ethical Committee of Mohammed V Souissi University, Rabat, Morocco.

Patients, who met the inclusion criteria and sign the informed consent, were entered into the study. All patients had at least 20 teeth, diagnosed as having AgP or ChP, and were ≤ 35 years of age. The exclusion criteria were patients medically compromised, or having received periodontal or antibiotic treatment within the preceding 6 months, patients under orthodontic treatment,

pregnant women or during lactation, and patients who need antibiotic prophylaxis before screening.

Clinical and radiographic examination

The following clinical variables were scored at six sites per tooth, and in all teeth except third molars: dichotomous plaque presence, bleeding on probing (BOP), probing pocket depth (PPD, assessed to the nearest millimeter using a standard periodontal probe), clinical attachment level (CAL, calculated as the distance from the cemento-enamel junction to the bottom of the periodontal pocket).

A full mouth periapical radiographic examination was also performed to confirm by evidence interproximal bone loss. Bone loss was estimated by determining the ratio of the distance from the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest. All clinical data was collected by the same examiner.

The diagnosis for the periodontal status was established for all subjects based on the 1999 International Classification of periodontal diseases and conditions [16]. The used clinical criteria were as follows. For aggressive periodontitis: 1) rapid attachment loss and bone breakdown were evident including at least one incisor and one first molar, 2) pocket depth ≥ 4 mm, clinical attachment loss ≥ 3 mm, presence of bleeding on probing. For chronic periodontitis: extensive deposits of plaque and calculus, more than 10% of teeth with pocket depth ≥ 4 mm, and at least one site having attachment loss ≥ 3 mm.

Bacterial sampling and analysis

Sampling collection was done within week after interviewing and clinical examination, by means of pooled subgingival samples from each patient. Subgingival plaque samples were collected from four deep sites, one per quadrant, from each patient.

Supragingival plaque, located in direct proximity to sample sites, was carefully removed using a scaler and cotton gauze. A sterile, absorbent paper point was gently inserted into the apical extent of the periodontal pocket (sulcus). After 20 seconds, the papers were pooled in a tube containing 1.5 ml of reduced transport fluid (RTF) medium [17]. All plaque samples were collected by the same examiner.

Microbiological procedures

Samples were transferred to the laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Dentistry, University of Complutense Madrid, Spain, within 24 hours, where they were homogenized by vortexing for 30 s [18], and serially diluted in phosphate-buffered saline (PBS). At the laboratory, aliquots of 0.1 ml were plated manually for the detection of *A. actinomycetemcomitans* on a specific medium

[19]. These plates were incubated for 3 days in air with 5% CO₂ at 37°C. Suspected isolates were identified on the basis of colony morphology (small colony, 1 mm in diameter, with a dark border and a “star” or “crossed cigars” shaped inner structure) and positive catalase reaction. Sample dilutions were also plated onto a non-selective blood agar plate (Blood Agar Base II®, Oxoid, Basingstoke, UK), supplemented with haemine (5 mg/l), menadione (1 mg/l) and 5% sterile horse blood. After 7–14 days of anaerobic incubation (80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂), total counts and counts of representative colonies (those with colony morphologies compatible with target pathogen morphology) were performed in the most suitable plates, those harboring between 30 and 300 colonies. Suspected colonies were further identified by microscopy, studying gram staining and enzyme activity (including N-acetyl-β-D-glucosaminidase, α-glucosidase, α-galactosidase, α-fucosidase, esculin, indole and trypsin-like activity). In addition, the black pigmented colonies of *P. gingivalis* and *P. intermedia* have been tested under red fluorescent light UV (360 nm): negative for *P. gingivalis* and positive for *P. intermedia* [20]. Counts were transformed in colony-forming units per milliliter of the original sample. Total anaerobic counts were calculated, as well as counts of the detected periodontal pathogens (*A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. intermedia/nigrescens*, *P. micra*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *Eubacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., and *F. nucleatum*). In addition to the quantitative microbiological data, the frequency of detection and proportions for each bacterial species were also calculated.

Data analysis

Different groups were compared: AgP and ChP, on one side; and localized and generalized AgP on the

other side. The patient was used as experimental unit for observation. Demographic and clinical data were calculated for each subject (mean ± standard deviation, when needed the median was used). Differences in demographic and clinical parameters among groups were established with the one-way analysis of variance test. Chi square test and Fisher's exact test were employed to compare the frequency of detection of different pathogens between groups. For counts of bacterial species, colony forming units were log transformed to achieve a normal distribution and ANOVA was used as a primary test to compare the three groups; as post hoc test, multiple rank tests were conducted when differences were detected. For proportions of anaerobic microflora, the Kruskal Wallis test was used primarily, while differences were explored post hoc by Mann–Whitney test. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

A total of 70 subjects were recruited in this study, divided in 50 cases of AgP (13 localized, 37 generalized) and 20 of ChP.

Clinical findings

In the comparison between AgP and ChP, demographic and clinical data of patients are summarized in Table 1. The mean age of patients was significantly lower in AgP than in ChP group (*p* < 0.001). Pockets were significantly deeper in AgP than in ChP patients (*p* < 0.001), and CAL was significantly higher for AgP (*p* < 0.001).

In the comparison between localized and generalized AgP, significantly more sites with plaque and gingival inflammation were observed in generalized AgP (*p* < 0.05) (Table 1).

Table 1 Demographic and clinical data in aggressive (localized and generalized) and chronic periodontitis groups

	Localized aggressive periodontitis (LAgP) n = 13	Generalized aggressive periodontitis (GAgP) n = 37	Chronic periodontitis (ChP) n = 20	P*
Gender: female/male (% female)	11/2 (84.6%)	29/8 (78.4%)	16/4 (80.0%)	>0.05
Age: mean ± standard deviation (range)	19.85 ± 4.616 (13; 26)	24.43 ± 5.058 (17; 36)	28.55 ± 4.347 (21; 35)	<0.001
Plaque index: median (range)	36.6% (25.9 - 72.5)	80.4% (53.9 - 100.0)	56.2% (45.1 - 76.0)	0.001
Bleeding on probing: median (range)	30.2% (23.1 - 68.9)	76.8% (59.1 - 100.0)	46.4% (33.7 - 59.9)	0.000
Probing pocket depth: mean ± standard deviation	6.23 ± 1.25	6.05 ± 0.95	4.46 ± 0.59	<0.001
Clinical attachment level: mean ± standard deviation	6.03 ± 1.94	5.18 ± 1.39	3.09 ± 1.20	<0.001

*P value for multiple comparisons by means on ANOVA. Statistically significant differences corresponded to.

Age: LAgP vs GAgP, *p* = 0.006; LAgP vs ChP, *p* < 0.001; GAgP vs ChP, *p* = 0.003.

Plaque index: LAgP vs GAgP, *p* = 0.001; GAgP vs ChP, *p* = 0.008.

Bleeding on probing: LAgP vs GAgP, *p* < 0.001; GAgP vs ChP, *p* < 0.001.

Probing pocket depth: GAgP vs ChP, *p* < 0.001; LAgP vs ChP, *p* < 0.001.

Clinical attachment level: GAgP vs ChP, *p* < 0.001; LAgP vs ChP, *p* < 0.001.

Table 2 Frequencies of detection [n positive (percentage)] of studied bacteria in aggressive periodontitis compared to chronic periodontitis

	Aggressive periodontitis			Chronic periodontitis n = 20
	Localized aggressive periodontitis	Generalized aggressive periodontitis	All aggressive periodontitis	
	n = 13	n = 37	n = 50	
<i>A.actinomycetemcomitans</i> *	6 (46.2%)	24 (64.9%)	30 (60.0%)	5 (25.0%)
<i>P. gingivalis</i> *	8 (61.5%)	33 (89.2%)	41 (82.0%)	12 (60.0%)
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	11 (84.6%)	32 (86.5%)	43 (86.0%)	18 (90.0%)
<i>T. forsythia</i>	6 (46.2%)	24 (64.9%)	30 (60.0%)	11 (45.0%)
<i>P. micra</i>	1 (7.7%)	11 (29.7%)	12(24.0%)	4 (20.0%)
<i>C. rectus</i>	2 (15.4%)	5 (13.5%)	7(15.0%)	3 (15.0%)
<i>F. nucleatum</i>	10 (76.9%)	31(82.4%)	41(82.0%)	16 (80.0%)
<i>Capnocytophaga spp.</i>	4 (30.8%)	10 (27.0%)	14(28.0%)	7 (35.0%)
<i>E. corrodens</i>	6 (46.2%)	9 (24.3%)	15(30.0%)	3 (15.0%)

*Statistically significant differences were detected, by means of Chi-square or Fisher Exact test, for.

A.actinomycetemcomitans: AgP vs ChP, $p = 0.080$; GAgP vs ChP, $p = 0.004$.

P. gingivalis: GAgP vs ChP, $p = 0.016$; GAgP vs LAgP, $p = 0.040$.

Microbiological findings

Frequency of detection

In the comparison between AgP and ChP, a tendency towards statistically significant differences was detected regarding the presence of *A. actinomycetemcomitans*: 60.0% in AgP versus 25.0% in ChP ($p = 0.08$). In both groups, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* and *T. forsythia* were frequently detected, with no statistically significant differences; however, *P. gingivalis* was more frequent in AgP than in ChP (82.0% versus 60.0%, respectively). *Capnocytophaga spp.*, *P. micra*, and *C. rectus* showed lower frequencies in both groups. *A. actinomycetemcomitans* was significantly more frequent in

generalized AgP than in ChP ($p = 0.004$). Also *P. gingivalis* was more prevalent in GAgP when compared with both LAgP ($p = 0.040$) and ChP ($p = 0.016$) Table 2.

Proportions of anaerobic microflora

Differences in mean proportions of *A. actinomycetemcomitans* were statistically significant among groups ($p = 0.004$), corresponding to lower proportions in ChP when compared to localized AgP (tendency, $p = 0.062$) and generalized AgP ($p = 0.001$). For *P. gingivalis*, means proportions were also significantly different among groups ($p = 0.038$), when higher values for generalized AgP when compared to localized AgP (tendency, $p = 0.064$) and

Table 3 Proportions (expressed as mean and standard deviation -sd) of total anaerobic microflora, isolated by culture in localized, generalized aggressive and chronic periodontitis

	Localized aggressive periodontitis		Generalized aggressive periodontitis		Chronic periodontitis		K-W*
	(LAgP) n = 13		(GAgP) n = 37		(ChP) n = 20		
	mean	sd	mean	sd	mean	sd	p value
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	18.16%	29.10%	11.55%	38.81%	0.05%	0.18%	0.004
<i>P. gingivalis</i>	12.49%	15.21%	28.25%	27.04%	13.78%	18.39%	0.038
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	5.78%	7.07%	4.92%	7.20%	4.78%	7.97%	0.598
<i>T. forsythia</i>	1.32%	2.58%	5.52%	8.32%	3.03%	7.76%	0.028
<i>P. micra</i>	0.09%	0.34%	0.91%	2.40%	1.18%	2.96%	0.298
<i>C. rectus</i>	0.55%	1.79%	0.08%	0.26%	0.10%	0.34%	0.958
<i>F. nucleatum</i>	1.96%	3.52%	1.43%	2.11%	1.90%	1.59%	0.266
<i>Capnocytophaga spp.</i>	0.67%	1.59%	0.93%	3.08%	0.12%	0.25%	0.902
<i>E. corrodens</i>	0.44%	0.87%	0.28%	1.00%	0.18%	0.40%	0.457

*Kruskal-Wallis test was used to compare the three groups; detected differences were explored by means of Mann Whitney test to compare two groups. Differences corresponded to.

A.actinomycetemcomitans: LAgP vs ChP, $p = 0.062$; GAgP vs ChP, $p = 0.001$.

P. gingivalis: LAgP vs GAgP, $p = 0.064$; GAgP vs ChP, $p = 0.014$.

T. forsythia: LAgP vs GAgP, $p = 0.027$; GAgP vs ChP, $p = 0.045$.

Table 4 Total anaerobic counts and counts of selected bacterial species (in logarithm, expressed as mean and standard deviation –sd) in localized, generalized and chronic periodontitis

	Localized aggressive periodontitis (LAgP) n = 13		Generalized aggressive periodontitis (GAgP) n = 37		Chronic periodontitis (ChP) n = 20		ANOVA*
	mean	sd	mean	sd	mean	sd	
Total counts	8.41	0.69	8.90	0.62	8.47	0.52	0.011
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2.62	2.99	3.32	2.62	0.81	1.47	0.019
<i>P. gingivalis</i>	3.93	2.81	5.37	2.35	3.52	3.01	0.030
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	4.35	2.14	4.79	1.85	3.95	1.99	0.297
<i>T. forsythia</i>	2.11	2.79	3.81	2.88	2.44	2.61	0.084
<i>P. micra</i>	0.39	1.42	1.47	2.33	1.03	2.13	0.290
<i>C. rectus</i>	0.79	1.94	0.61	1.58	0.69	1.69	0.939
<i>F. nucleatum</i>	3.15	2.23	4.05	1.88	3.98	1.82	0.337
<i>Capnocytophaga spp.</i>	1.28	2.03	1.41	2.22	1.23	1.95	0.953
<i>E. corrodens</i>	1.60	2.16	1.09	2.19	0.94	1.71	0.655

*ANOVA test was used to compare all groups, and multiple range tests to identify the explanation of the detected differences.

Total counts: GAgP, versus LAgP and ChP.

A. actinomycetemcomitans: ChP, versus LAgP and GAgP.

P. gingivalis : GAgP versus ChP.

ChP ($p = 0.014$). Finally, significant differences among groups for *T. forsythia* ($p = 0.028$) corresponded to significant higher counts in generalized AgP, as compared to localized AgP ($p = 0.027$) and ChP ($p = 0.045$) Table 3.

Total anaerobic counts and counts of specific pathogens

Total anaerobic counts were significantly different among groups ($p = 0.011$), and the differences corresponded to higher levels in generalized AgP when compared to the other two groups. Also, significant differences among groups were detected for *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0.019$) and *P. gingivalis* ($p = 0.030$), associated to lower counts in ChP as compared to the AgP groups, and to higher counts for generalized AgP as compared to ChP, respectively Table 4.

Discussion

The results of the present cross-sectional study has shown distinct microbiological profiles for different types of periodontitis, namely localized and generalized AgP and ChP. *A. actinomycetemcomitans* was significantly more frequent in generalized AgP than in ChP, and *P. gingivalis* was also more prevalent in generalized AgP than in both localized AgP and ChP. Other significant differences among conditions were detected for proportions of anaerobic microflora for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia*, and for total anaerobic counts and counts of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*.

Conversely, for other pathogens, similar results were found, such as for *P. intermedia*, *Capnocytophaga spp.*, *F. nucleatum*, *P. micra* or *C. rectus*. These results may support previous data showing that, when considered as

a whole, the subgingival microbiota may not differ significantly between AgP and ChP [21–26]. And, as showed in earlier worldwide studies on periodontal microbiota, this study confirm the presence and interspecies relationships of periodontopathic bacteria [11,27–29]. Ximenez-Fyvie et al. [26] employed the checkerboard DNA-DNA hybridization technique to describe the subgingival microbial composition of 77 Mexican subjects and found that the microbial differences between generalized AgP and generalized ChP subjects were only discrete and none of the 40 bacterial species tested seemed to specifically differentiate the subgingival microbial profile of either periodontitis groups. Takeuchi et al. [25] used polymerase chain reaction (PCR) to determine the prevalence and culture to study the proportion of seven subgingival species in samples from 93 Japanese subjects with AgP, ChP or healthy conditions. A significantly higher percentage of generalized AgP and generalized ChP were carriers of *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *Treponema denticola* than periodontally healthy subjects. And the proportions of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* were similar in all periodontitis groups. Heller et al. [30] evaluated the presence of 40 bacteria by the means of checkerboard DNA-DNA hybridization technique, on Brazilian population (75 individuals with AgP and 185 with ChP). They found that only few species differed between AgP and ChP, *P. gingivalis* and *T. denticola* were related to ChP, while *Eubacterium nodatum* was associated with AgP. The same authors reported that *A. actinomycetemcomitans* was very frequent in ChP and AgP and significant differences of *A. actinomycetemcomitans* between the two forms of disease are related to specific

clone type or serotypes and not only the presence or levels of this pathogen. Mombelli et al. [23] evaluated whether the presence or absence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, and *C. rectus* could distinguish between ChP and GAgP. They concluded that these bacteria presented a limited interest in discriminatory ability to identify subjects with GAgP or ChP. However, a diagnosis of GAgP was more likely in subjects positive for Aa than subjects negative for this bacterium. Moreover, the highly leukotoxic strain was uniquely associated with AgP. Mahalakshmi et al. [31] reported that in addition to *A. actinomycetemcomitans*; the prevalence of *P. gingivalis* and *T. forsythia* was also high in periodontitis and while *A. actinomycetemcomitans* showed a positive association with AgP while *T. denticola* was associated with ChP.

In the present study, statistically significant differences regarding the frequency of detection were reported: e.g. *A. actinomycetemcomitans* was more frequently isolated in AgP than in ChP (60.0% versus 25.0%; $p = 0.080$), supporting previous data showing that this bacterial species is highly associated with AgP in Morocco, either when using culture or PCR as a detection method [32,33]. In addition, despite the importance of *A. actinomycetemcomitans* in periodontitis, in the present report it was a frequent finding the co-occurrence of two or more species of the studied bacteria within the same patient. Ashimoto et al. [34] reported that there is a symbiotic relationship between micro-organisms in periodontal pockets. Indeed, a pathogen may colonize subgingival sites already occupied by other bacteria. Or some bacteria may occur together in periodontal lesions because they both produce destructive disease without interacting with each other.

P. gingivalis is highly prevalent among subjects with ChP [35-38]. In AgP, its frequency varies between 62% and 100% in different populations [25,39,40]. In the present study, *P. gingivalis* was isolated in 82.0% and 60.0% of AgP and ChP, respectively, and the differences were statistically significant. These results suggest that *P. gingivalis* may be also an important pathogen in AgP patients in Morocco. The presented frequencies are similar to the frequencies reported in Colombia (74.6% and 68.2%, respectively) [39] or Chile (88.8% and 76.4%, respectively) [41].

In the present research, the frequency of *T. forsythia* isolation was slightly higher in AgP compared to ChP. Botero et al. [42] reported a frequency of 50% in both forms of periodontitis in Colombia. Many studies suggested that *T. forsythia* is associated with progressive periodontitis [43-45] and "refractory" periodontitis [46,47]. More recently, Tomita et al. [48] studied the prevalence and levels of Aa, Pg and *T. forsythia* in subgingival plaque samples of a group of 40

Japanese patients with aggressive and chronic periodontitis (20 AgP and 20 ChP). The authors reported that no distinct pattern of the subgingival bacteria profile was discerned between the two entities, except for *T. forsythia* which was significantly higher in ChP subjects than in AgP subjects. They added also that bacterial account for Pg and *T. forsythia* were positively correlated with pockets depth and clinical attachment loss which corroborate the role of those bacteria belonging to the red complex in pathogenesis of periodontitis.

Based on the clinical examination (PPD, CAL) and radiographic patterns of periodontal destruction, AgP patients were subdivided into localized or generalized. The most frequent pathogens in both conditions were *P. gingivalis* (61.5%), *P. intermedia* (84.6%) and *F. nucleatum* (76.9%), for localized AgP, and *P. gingivalis* (89.2%), *P. intermedia* (86.5%), *T. forsythia* (64.9%), and *F. nucleatum* (82.4%), for generalized AgP. Lee et al. [22] used PCR to determine the prevalence of seven putative periodontal pathogens in 39 Korean AgP patients and reported that all the studied bacteria, *A. actinomycetemcomitans* (75%), *P. gingivalis* (96.8%), *P. intermedia* (78.8%), *T. forsythia* (94.2%), *Fusobacterium* spp. (99.4%), *Treponema* spp. (96.8%) and *Parvimonas micra* (85.9%), were frequently associated with AgP in this population. In particular *P. intermedia* was significantly associated with generalized AgP. In Japan, subgingival samples were collected from 50 patients with AgP (10 localized, 40 generalized) and 35 samples from generalized ChP. *T. forsythia* and *P. gingivalis* were detected more frequently at sites where the attachment loss was severe ($CAL \geq 6$ mm), in comparison with those with moderate attachment loss ($CAL < 6$ mm) in patients with localized AgP. This trend was also observed for *P. gingivalis*, among patients with generalized AgP. However, the positive correlation between the presence of *C. rectus*/*T. denticola* and the severity of the clinical attachment loss was not found in any of the three groups of periodontitis [25]. Kowalski et al. [49] reported that high frequency detection of *A. actinomycetemcomitans* and *C. rectus* in generalized Ag periodontitis. In our study *C. rectus* showed low occurrence either in aggressive periodontitis and chronic periodontitis its titers were low to in the two entities.

In our study, when studying the counts and proportions of cultivated bacteria, *P. gingivalis* and *T. forsythia* showed a stronger association to generalized AgP in comparison with either localized AgP or ChP. Thus, these results may suggest that *P. gingivalis* could play a major role in the pathogenesis of generalized AgP in this population. Conversely, no significant differences in the frequency of detection, counts or proportions were detected in the present study, between localized and generalized AgP for *A. actinomycetemcomitans*. These

results are in contrast with previous data in a Moroccan population, using PCR, which showed that the presence of *A. actinomycetemcomitans* was significantly associated with localized AgP compared to generalized AgP [32].

The previously mentioned discrepancy could be explained in part by the fact that PCR is more sensitive for bacterial detection, with lower detection thresholds (and localized AgP may harbor lower amounts of the target bacteria, as shown in Table 4). But also, by the fact that in the present study, the sampling strategy included a pooled subgingival sample of the four deepest pockets (one per quadrant) and, therefore, the occurrence of pathogens may have been underestimated. Other explanation could be the small sample size for localized comparing to generalized AgP. It should be also highlighted that culture cannot distinguish between high and low virulent strains of *A. actinomycetemcomitans*. Culture investigations have shown that the level of subgingival cultivated microbiota *A. actinomycetemcomitans* is lower than those of *P. gingivalis* in adult patients with periodontitis [50]. The difference between the levels of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* was also demonstrated by Rams et al. [29] who examined subgingival samples of 1,800 patients with periodontitis. The average proportion of *A. actinomycetemcomitans* in the microbiota was 4%, while that of *P. gingivalis* was 23%. Compared to other periodontal bacteria, such as *P. intermedia/nigrescens*, *C. rectus* or *P. micra*, the proportion of *P. gingivalis* was also higher [29].

Depending on criteria that a bacterium of total subgingival cultivated flora above a certain minimal threshold to be associated with periodontitis, it has been suggested that this threshold is 0.1% for *P. gingivalis* [51], 0.01% for *A. actinomycetemcomitans* [36,51], 2.5% for *P. intermedia* [43,51], 5% for *F. nucleatum* and *Capnocytophaga* spp. [43,52], 1% for *E. corrodens* [43,52], and 2% for *C. rectus* [43,53].

Differences detected in the present study may not represent true differences in the population. The differences in percentages of detection of periodontal pathogens found worldwide between studies may be due to geographical differences, socio-economic status as well as to the genetic factor of the host. It is to note also that a strict comparison is difficult because of the detection method and laboratory standards may differ between team researchers, clinical criteria used in studies may be different to, mild or severe, localized or generalized periodontal breakdown. However, as mentioned by Lourenco et al. [54], a microbial consortium combining *A. actinomycetemcomitans* and other potential pathogens may be helpful to discriminate between AgP and CP. Further studies on large samples are needed. Microbiological aspect of periodontitis and especially aggressive periodontitis is peace of the

complex multifactorial etiology that should be taken in consideration to help in better mentoring and treatment of this entity.

Conclusions

This study confirms the association of *A. actinomycetemcomitans* with localized and generalized AgP in Morocco, while *P. gingivalis* was highly associated with generalized AgP. Differences in frequency of detection, counts and proportions of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* suggests the presence of distinct microbiological profiles for localized AgP, generalized AgP and ChP patients. More studies are necessary to understand the role of these bacterial species in aggressive periodontitis pathogenesis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Authors' contributions

HC carried out acquisition of data and draft the manuscript. MM carried out the acquisition of data and culture. DH participated in the design of the study, performed the statistical analysis and revised critically the manuscript. MS participated in the design of the study and its coordination. OKE conceived of the study, participated to its coordination and collecting data, and revised critically the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by the Mohammed V Souissi University, Rabat Morocco (Grant 002/FMD/2011) and Faculty of Dentistry, University Complutense, Madrid, Spain. The authors thank Itziar González and Ana O'Connor for their valuable assistance at the Laboratory of the Faculty of Dentistry, University Complutense.

Author details

¹EREB (Research Group of Oral Ecosystem), Faculty of Medicine Dentistry, Mohammed V University, Rabat, Morocco. ²EPEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, Faculty of Dentistry, University Complutense, Madrid, Spain.

Received: 22 July 2014 Accepted: 9 February 2015

Published online: 24 February 2015

References

1. Philstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. Lancet. 2005;366:1809–20.
2. Sanz M, van Winkelhoff AJ. Periodontal infections: understanding the complexity. Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol. 2011;38 Suppl 11:3–6.
3. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005;38:135–87.
4. Faveri M, Figueiredo LS, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2009;36:739–49.
5. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2005;32:860–6.
6. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. Periodontol 2000. 2006;40:50–76.
7. Curtis MA, Slaney JM, Aduse-Opoku J. Critical pathways in microbial virulence. J Clin Periodontol. 2005;32 Suppl 6:28–38.
8. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. Periodontol 2000. 2006;40:77–93.
9. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res. 1970;49:203–22.

10. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Periodontol 2000. 1999;20:136–67.
11. Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolff F, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. J Periodontol Res. 2000;35:232–41.
12. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. Periodontol 2000. 2004;36:14–26.
13. Haubek D, Ennibi O, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. Early onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leucotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Dental Res. 2001;80:1580–3.
14. Haubek D, Ennibi O, Poulsen K, Væth M, Poulsen S, Benzarti N, et al. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. Lancet. 2008;371:237–42.
15. Chahboun H, Filali Maltouf A, Ennibi O. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in aggressive periodontitis in Morocco- preliminary study. Odontostomatol Trop. 2013;36:5–10.
16. Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann periodontol. 1999;4:1–6.
17. Syed SA, Loeshe WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl Microbiol. 1972;24:638–44.
18. Dahlén G, Renvert S, Wikstrom M, Egelberg J. Reproducibility of microbiological samples from periodontal pockets. J Clin Periodontol. 1990;17:73–7.
19. Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, low cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Microbiol. 2001;39:509–13.
20. Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. J Clin Periodontol. 1986;13:912–7.
21. Mahalakshmi K, Krishnan P, Chandrasekaran SC, Panishankar KH, Subashini N. Prevalence of periodontopathic bacteria in the south subgingival plaque of a south indian population with periodontitis. J Clin Diag Res. 2012;4 suppl 2:747–52.
22. Lee J, Choi B, Yoo Y, Choi S, Cho K, Chai J, et al. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. J Periodontol. 2003;74:1329–35.
23. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. J Clin Periodontol. 2002;29 Suppl 3:10–21.
24. Pocolos DK, Lerche-Sehm J, Abron A, Fine JB, Papapanou PN. Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2005;32:1055–61.
25. Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. J Periodontol. 2003;74:1460–9.
26. Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruri E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2006;33:869–77.
27. Ali RW, Velcescu C, Jivanescu MC, Lofthus B, Skaug N. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. J Clin Periodontol. 1996;23:133–9.
28. Doğan B, Antinheimo J, Çetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E, et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. J Periodontol. 2003;74:803–14.
29. Rams TE, Flynn MJ, Slots J. Subgingival microbial associations in severe human periodontitis. Clin Infect Dis. 1977;25 Suppl 2:S224–6.
30. Heller DB, Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Colombo APV. Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. Arch Oral Biol. 2012;57:973–80.
31. Mahalakshmi K, Krishnan P, Chandrasekaran SC, Panishankar KH, Subashini N. Prevalence of periodontopathic bacteria in the subgingival plaque of a South Indian population with periodontitis. J Clin Diagn Res. 2012;6:747–52.
32. Ennibi O, Benrachadi L, Bouziane A, Haubek D, Poulsen K. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in localized and generalized forms of aggressive periodontitis. Acta Odontol Scand. 2012;70:318–22.
33. Haubek D, Ennibi O, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early-onset periodontitis patients. J Clin Periodontol. 2002;29:657–60.
34. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 1996;11:266–73.
35. Ali RW, Bakken V, Nilsen R, Skaug N. Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. J Periodontol. 1994;65:1046–52.
36. Ali RW, Johannessen AC, Dahlén G, Socransky SS, Skaug N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. J Clin Periodontol. 1997;24:830–5.
37. Dahlén G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Black-pigmented bacteroides species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. J Clin Periodontol. 1989;16:305–10.
38. Hamlet SM, Cullinan MP, Westerman B, Lindman M, Bird PS, Palmer J, et al. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population. J Clin Periodontol. 2001;28:1163–71.
39. Lafaurie GI, Contreras A, Baron A, Botero J, Mayoga-Fayad I, Jaramillo A, et al. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: A multicenter study. J Periodontol. 2007;78:629–39.
40. da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo APV. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. Arch Oral Biol. 2011;56:899–906.
41. Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras A, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. J Periodontol. 2005;76:289–94.
42. Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. J Periodontol. 2007;78:696–704.
43. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1988;15:316–23.
44. Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1988;15:240–6.
45. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol. 2002;29:1023–8.
46. Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1988;15:390–8.
47. Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Vangsted T, Van der Velden U. Effects of metronidazole in patients with “refractory” periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. J Clin Periodontol. 1997;24:573–9.
48. Tomita S, Komiya-Ito A, Imamura K, Kita D, Ota K, Takayama S, et al. Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. Microb Pathog. 2013;61–62:11–5.
49. Kowalski J, Górski R. Clinical and microbiological evaluation of biofilm- gingival interface classification in patients with generalized forms of periodontitis. Pol J Microbiol. 2014;63:175–81.
50. Van der Weijden GA, Timmerman MF, Reijese E, Wolffe GN, van Winkelhoff, van der Velden U. The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis. J Clin Periodontol. 1994; 21:583–8.
51. Bragd L, Dahlén G, Wikstrom M, Slots J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedium* to indicate progressive periodontitis: a retrospective study. J Clin Periodontol. 1987;14:95–9.
52. Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. J Clin Periodontol. 1985;12:648–59.
53. Tanner AC, Dzink JL, Ebersole JL, Socransky SS. *Wolinella recta*, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis*, and *Eikenella corrodens* from periodontal lesions. J Periodontol Res. 1987;22:327–30.
54. Lourenço TG, Heller D, Silva-Boghossian CM, Cotton SL, Paster BJ, Colombo AP. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. J Clin Periodontol. 2014;41:1027–36.

Artículo 4

Artículo 4:

Mínguez M, Ennibi OK, Perdiguero P, Lakhdar L, Abdellaoui L, Sánchez M, Sanz M, Herrera D Antimicrobial susceptibilities of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* strains from periodontitis patients in Morocco. *International Journal of Antimicrobial Agents* (enviado para publicación).

Susceptibilidades a antibióticos de cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* aisladas en pacientes con periodontitis en Marruecos.

Antecedentes y objetivos: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* han sido aislados frecuentemente en pacientes con periodontitis en Marruecos; su persistencia tras el desbridamiento subgingival se ha asociado con peores resultados clínicos. El objetivo de este estudio es evaluar las susceptibilidades a la amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulánico, metronidazol y azitromicina de ambos periodonto-patógenos. Además, se comparan los perfiles microbiológicos de los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* o para ambos.

Material y métodos: Las muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis se procesaron mediante cultivo. En 54 cepas, se llevaron a cabo los test de susceptibilidad frente a los cuatro antibióticos mencionados mediante el método Epsilométrico (E-test®).

Resultados: La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* fue de 79.5% y 84.4%, respectivamente. *A. actinomycetemcomitans* mostró susceptibilidad frente a la amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulánico, mientras el 28% de las muestras fueron resistentes a la azitromicina y el 61.7% al metronidazol. *P. gingivalis*, sin embargo, fue susceptible a todos los antibióticos testados.

Conclusiones: *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* se aislaron frecuentemente en pacientes con periodontitis en Marruecos. Sólo se encontró resistencia al metronidazol y la azitromicina en el caso de *A. actinomycetemcomitans*.

Manuscript Number:

Title: Antimicrobial susceptibilities of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* strains from periodontitis patients in Morocco.

Article Type: Original Article

Keywords: antimicrobial susceptibilities; periodontitis; Morocco; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Porphyromonas gingivalis*

Corresponding Author: Mrs. María Mínguez,

Corresponding Author's Institution: University Complutense of Madrid

First Author: María Mínguez

Order of Authors: María Mínguez; Oum Keltoum Ennibi; Pilar Perdiguero; Leila Lakhdar; Lamia Abdallaoui; Maria Sánchez; Mariano Sanz; David Herrera

Abstract: Background and Objective: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* have been frequently isolated in periodontitis patients in Morocco. Its persistence after the subgingival debridement of the biofilm has been correlated with worse clinical outcomes. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibilities of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, to amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin. In addition, microbiological profiles of patients harbouring *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, or both, were compared.

Material and methods: In consecutive periodontitis Moroccan patients, subgingival samples were taken and processed by culture. *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* colonies were isolated (54 strains) and susceptibility tests, using the Epsilometric method, were run for amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin. Minimum inhibitory concentrations for 50% (MIC₅₀) and 90% (MIC₉₀) of the organisms were calculated.

Results: The prevalence of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* was 79.5% and 84.4%, respectively. *A. actinomycetemcomitans* showed susceptibility to amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, while 28% of the isolated strains were resistant to azithromycin and 61.7% towards metronidazole. No *P. gingivalis* resistance towards amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin was found. **Conclusion:** *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were frequently detected in Moroccan patients with periodontitis, while antimicrobial resistance was only detected for *A. actinomycetemcomitans* to metronidazole and azithromycin.



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Odontología

Prof Mariano Sanz , Prof David Herrera
Facultad de Odontología
Universidad Complutense de Madrid
Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid. España.
Tfno: +34 91 3942021, 1907 - Fax: +34 91 3941910
Email: marianosanz@ucm.es, davidher@ucm.es

International Journal of Antimicrobial Agents - Editor
Dr. Rolain

Madrid, April 10th, 2017

Dear Dr. Rolain:

We hereby send you our manuscript entitled: ***“Antimicrobial susceptibilities of Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis strains from periodontitis patients in Morocco.”*** for your consideration to be published in the **International Journal of Antimicrobial Agents**.

We certificate that this manuscript is original, has not been published elsewhere, either completely, in part, or in another form and it is not presently under consideration for another journal. Furthermore, it is free of conflict of interest, has been conducted by the highest principles of clinical research and has been read and approved by all of the authors.

Yours sincerely,

Mariano Sanz

David Herrera

TITLE: Antimicrobial susceptibilities of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* strains from periodontitis patients in Morocco.

Authors: Mínguez M¹, Ennibi OK², Perdiguero P³, Lakhdar L², Abdellaoui L², Sánchez MC³, Sanz M^{1,4}, Herrera D^{1,4}

1 Section of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain.

2 EREB (Oral Ecosystem) Research group, Faculty of Medicine Dentistry, Mohammed V University in Rabat, Morocco.

3 Laboratory of Research, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain.

4 ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, University Complutense, Madrid, Spain.

Corresponding author:

David Herrera.

Faculty of Odontology (Ciudad Universitaria)

Plaza Ramón y Cajal s/n

28040 Madrid

SPAIN

Tel: (+34) 913941907

Fax: (+34) 913941910

E-mail: davidher@ucm.es

Running title: Antimicrobial susceptibilities in periodontitis patients in Morocco.

Key words: antimicrobial susceptibilities; periodontitis; Morocco; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Porphyromonas gingivalis*

Abstract

Background and Objective: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* have been frequently isolated in periodontitis patients in Morocco. Its persistence after the subgingival debridement of the biofilm has been correlated with worse clinical outcomes. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibilities of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, to amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin. In addition, microbiological profiles of patients harbouring *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, or both, were compared.

Material and methods: In consecutive periodontitis Moroccan patients, subgingival samples were taken and processed by culture. *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* colonies were isolated (54 strains) and susceptibility tests, using the Epsilometric method, were run for amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin. Minimum inhibitory concentrations for 50% (MIC₅₀) and 90% (MIC₉₀) of the organisms were calculated.

Results: The prevalence of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* was 79.5% and 84.4%, respectively. *A. actinomycetemcomitans* showed susceptibility to amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, while 28% of the isolated strains were resistant to azithromycin and 61.7% towards metronidazole. No *P. gingivalis* resistance towards amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin was found.

Conclusion: *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were frequently detected in Moroccan patients with periodontitis, while antimicrobial resistance was only detected for *A. actinomycetemcomitans* to metronidazole and azithromycin.

Introduction

Periodontitis is a chronic inflammatory disease causing destruction of the dental attachment apparatus. Patients suffering from this disease often suffer discomfort, disability in chewing, and loss of their overall life quality. Furthermore, this chronic inflammatory condition causes systemic inflammation and has been associated with cardiovascular diseases, diabetes, or preterm birth [1-4].

Periodontitis has a complex aetiology, being the main aetiological factor the bacteria present in the subgingival biofilm. Although more than 700 bacterial species have been identified in the oral cavity [5], a limited number of pathogens have shown a higher degree of virulence. Among them, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* have demonstrated to be strongly associated to the onset and progression of periodontitis [5]. Furthermore, these microorganisms live in complex communities within a glycocalyx matrix, organised as biofilms adhered to the tooth structure, what confers these communities specific phenotypes, including reduced susceptibility to antimicrobials [6].

A highly virulent strain of *A. actinomycetemcomitans* (serotype b, JP2 clone) has been identified as endemic in North Africa and highly associated with aggressive periodontitis [7-9]. However, there is limited data on the prevalence of this bacteria in Morocco and the relative frequency of the highly virulent species. Haubek et al have reported a carrier rate of 63.8% in a cohort of young adolescents and a recent study from our research group has reported a prevalence in 35.6% in an slightly older population [9, 10].

P. gingivalis is also considered to be a key pathogen with a strong association with periodontitis [11]. Its pathogenic virulence is due, in part, to the expression of highly proteolytic proteinases Arg-gingipain and Lys-gingipain that cause inflammation and evade host immune responses [12]. In a Moroccan population, Chahboun et al. found statistically significant differences in the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* and

P. gingivalis when comparing chronic (25% and 60%, respectively) and aggressive periodontitis (60% and 82%, respectively) [13].

Although the prevalence of chronic periodontitis varies among countries with reported values between 13% and 57%, there are no clear differences among different ethnic groups [14]. However, when focusing on the most aggressive forms of periodontitis, their reported prevalence in Morocco has been significantly higher (7.6%) than in other populations (1-2.6%) [7]. In light of these high prevalences and the frequent detection of key periodontal pathogens, measures of prevention and therapy focused on these pathogens should be implemented.

The treatment of chronic periodontitis is usually rendered by mechanical debridement of the subgingival biofilm, resulting in long-term favourable clinical outcomes [15]. However, there are patients and sites with poorer clinical outcomes, which have been related to the persistence of specific periodontal pathogens, including *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* [16]; and in these situations, the use of systemic antimicrobials has been suggested, as an adjunct to mechanical debridement [17, 18]. The systemic antimicrobials most frequently used in dental practices are amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin. Their relative efficacy, however, depends on the level of antimicrobial resistance, which varies among countries, being related to the overuse or misuse of antibiotics [19-22]. To the best of our knowledge, studies assessing the antimicrobial susceptibility profiles of periodontal pathogens in Moroccan patients with periodontitis are lacking. Therefore the objective of the present investigation is to evaluate the antimicrobial susceptibilities of two of the key periodontal pathogens, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* from a Moroccan population with periodontitis to amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin. In addition, microbiological profiles of patients harbouring *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, or both, were compared.

Material and methods

Study population

Microbiological subgingival samples were collected from a convenience sample of consecutive patients seeking treatment in the Department of Periodontology at the Faculty of Medicine Dentistry of Mohammed V University in Rabat, Morocco, between January 2011 and December 2012. All patients were of African ethnicity residing in Morocco. A previous publication has already reported information from this patient sample [13], but in the present study only those patients positive for *A. actinomycetemcomitans* or for *P. gingivalis*, or both, have been included.

All subjects were verbally informed about the investigation, and they were asked to sign an informed consent. The study protocol was approved by the Biomedical Research Ethical Committee at the University Mohammed V of the Faculty of Medicine and Pharmacy of Rabat (reference number: 400/2010). Patients, who met the following inclusion criteria were entered into the study:

- patients younger than 35 years at the moment of the diagnosis;
- being systemically healthy, without any acute pathology;
- having at least 20 teeth;
- patients with chronic or aggressive periodontitis, according to the criteria defined by Armitage in 1999[23].

Subjects were excluded if they were smokers, medically compromised, pregnant or in lactation, or when they were on any medication relevant for the study, such as intake of systemic antibiotics within the previous 6 months or when there was a need of antibiotic prophylaxis.

Clinical and radiographic examination

Patients were clinically examined after taking a brief medical and smoking history, and they were diagnosed as suffering chronic or aggressive periodontitis [23], either localized or generalized, according to the extension of the disease.

Four sites were selected for microbiological sampling. In these selected sites, plaque index (PII), using a visual dichotomous evaluation, bleeding on probing (BOP) and suppuration (dichotomously registered), probing pocket depth (PPD) and recession (REC), were recorded by two experienced investigators (M.M. and O.E.).

A full-mouth periapical radiographic examination was also performed. Bone loss was estimated by determining the distance from the cemento-enamel junction (CEJ) to the alveolar bone crest in millimetres in relation to the distance between the CEJ and the apex.

Microbiological sampling

Subgingival microbiological samples were taken from the site, in each quadrant, with the deepest pocket [24]. Supragingival plaque, located in direct proximity to the sample site, was carefully removed using sterile gauze to avoid bleeding and isolated with sterile cotton rolls and gentle air drying. Two (per site) consecutive sterile, absorbent paper points (medium size, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) were gently inserted into the apical extent of the pocket. After 10 s, the paper point was removed and pooled in a tube containing 1.5 mL of Reduced Transport Fluid (RTF) medium [25]. All plaque samples were collected by the same examiner. Samples were transported for processing to the Laboratory of Microbiology at the Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain, within 24 hours.

Culture and isolation

Samples were homogenized by vortexing and serially diluted in phosphate buffer saline (PBS). At the laboratory, aliquots of 0.1 mL were plated on two different media: blood agar medium (No. 2 of Oxoid; Oxoid Ltd., Basingstoke, England), with 5% horse blood, and haemin (5 mg/L) and menadione (1 mg/L) and Denta-1 medium [26].

Blood agar plates were studied after 7 and 14 days of anaerobic incubation (80% N₂, 10% H₂; 10% CO₂ at 37°C) and the specific pathogens: *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Capnocytophaga* spp. and *Fusobacterium nucleatum* were identified based on the colony morphology.

Colonies of each bacterial species were counted as the total number of colonies in a representative plate (those with between 30 to 300 colonies). Dentaid-1 plates were used for selective isolation and growth of *A. actinomycetemcomitans*. They were incubated at 37°C in air with 5% CO₂ and after 3-5 days, they were carefully examined for the identification of *A. actinomycetemcomitans*, based on its typical colony morphology, a positive catalase reaction and a set of specific enzymes (Rapid ID, NH system Romel Inc, Waltham, Massachusetts, USA).

Suspected colonies were evaluated by microscopy, Gram staining and enzyme activity (including N-acetyl-β-D-glucosaminidase, α-glucosidase, α-galactosidase, α-fucosidase, esculin, indole and trypsin-like activity). Counts were transformed in colony-forming units per millilitre (CFU/mL) of the original sample. Total anaerobic counts were calculated, as well as counts of the detected periodontal pathogens. In addition, the frequency of detection and the proportions for each bacterial species were also calculated.

Antimicrobial susceptibilities

From each positive sample for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, one to three strains were isolated (up to 10 passes per strain) and stored at -80°C until further use.

The minimal inhibitory concentrations (MIC) of strains belonging to those two bacterial species were determined for amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin using the Epsilometric test (E-test) (AB Biodisk, Solna, Sweden) [27]. The previously isolated and stored bacterial strains were grown on blood agar plates (Oxoid no. 2) supplemented with 5% sheep blood, haemin (5 mg/L) and menadione (1 mg/L) for 5 days. Then, they were suspended in sterile PBS equivalent to a 0.5 McFarland standard and streaked confluent over the surface of the 150 mm diameter blood agar plates. In order to avoid drug interactions, only two strips were placed per plate. Plates were incubated in 80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂ for 3 days. Inhibition zones were measured according to the recommendations of the manufacturer. All strains were tested in duplicate in the same plate and some selected ones were tested

in two-three separate experiments for quality control. *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) was used as a reference strain for susceptibility testing.

Data analysis

Demographical, clinical and microbiological data were presented for the whole population, and specifically for those patients providing strains for the susceptibility tests for *A. actinomycetemcomitans* or for *P. gingivalis*. Demographic data (age, gender and periodontitis type), clinical data [PII, BOP, PPD, REC and clinical attachment level (CAL) from the four sample sites] and microbiological data (mean CFU and mean proportions), were compared among groups.

With regards to antimicrobial susceptibilities, the concentrations to which 50% and 90% of the strains were susceptible were defined as MIC50 and MIC90, respectively. Results from each strain and each antibiotic were expressed in mg/mL. In addition, the range was provided. Qualitative results were obtained by comparing each strain with a pre-defined breakpoint. When the MIC value was lower than the breakpoint, a strain was considered as susceptible. Conversely, it was considered resistant if it was equal to or higher than the breakpoint. According to “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” [28], the pre-defined breakpoints were as follows: for amoxicillin, when the value was lower or equal than 0.5 mg/mL the strain was susceptible, it was resistant when the value was higher than 2mg/mL; these values for amoxicillin plus clavulanate were 4 mg/mL and 8 mg/mL, respectively. For metronidazole, the value was 4 mg/mL, and for azithromycin, 2 mg/mL [22].

Results

Study population

45 non-smoking patients positive for *A. actinomycetemcomitans*, for *P. gingivalis* or for both provided strains for the antimicrobial susceptibility. The demographic characteristics of the whole population and of those specifically providing *A.*

actinomycetemcomitans (n=22) or *P. gingivalis* (n= 29) strains (six patients provided strains of both pathogens) are shown in Table 1.

The whole population was mainly composed of females; being their mean age 22 years in the *A. actinomycetemcomitans*-positive group and 29 years in the *P. gingivalis*-positive group. The sampled population included more patients with aggressive periodontitis than with chronic periodontitis in both groups.

Clinical variables

Clinical data are presented in Table 2. Mean PPD of the whole population was 7.57mm, with almost no differences between groups (*P. gingivalis* group 7.47 mm; *A. actinomycetemcomitans* group 7.36 mm). Similarly, mean CAL was 8.10 mm, with similar findings in both groups. A difference of 0.11 mm in the mean values of CAL was found between groups, being higher in the *A. actinomycetemcomitans* group (7.99 mm in *A. actinomycetemcomitans* group; 7.88 mm in *P. gingivalis* group), while similar values were also found for BOP, or suppuration (15.9%-14.7%).

Microbiological profiles

The microbiological characteristics are depicted in Tables 3 and 4.

Frequency of detection of different bacterial species (Table 3)

In the whole population, the frequency of the detection of *P. gingivalis* was higher (84.4%) when compared to that of *A. actinomycetemcomitans* (79.5%). Within this population, *P. intermedia*, *T. forsythia* and *F. nucleatum* presented a high prevalence, with values between 72.7% and 93.2%.

When comparing those patients specifically providing strains of *A. actinomycetemcomitans* or *P. gingivalis*, similar prevalence of *P. intermedia* (around 90%), *C. rectus* (18%-21%) and *P. micra* (22.7%-25%) was observed, while *T. forsythia*, *F. nucleatum* and *Capnocytophaga* spp. showed a wider range of variability.

Total anaerobic counts and proportions in positive samples of different bacterial species (Table 4)

The mean of the total counts of the whole sample was 6.74 CFU/mL and it was higher in the *P. gingivalis* group than in the *A. actinomycetemcomitans* group (7.02 CFU/ml versus 6.40 CFU/ml). Total counts of different species were significantly different when comparing both groups. In the *P. gingivalis* group, patients presented more colonies of different species when compared to the same values in the *A. actinomycetemcomitans* group, except for *F. nucleatum* and *Capnocytophaga* spp., that presented higher values in the *A. actinomycetemcomitans* group.

When analysing the proportions of different bacterial species in the whole population, a mean value of 12.3% for *A. actinomycetemcomitans* and 23.9% for *P. gingivalis* were found. *P. intermedia*, *T. forsythia* and *F. nucleatum* were found in lower percentages (2%-6%) and even lower for *P. micra*, *C. rectus* and *Capnocytophaga* spp. (below 1%). In both *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* groups, the mean proportions of the analysed bacterial species followed the same pattern as for the whole population sample.

Antimicrobial susceptibilities

MIC value range, MIC50, MIC90 and percentage of resistant strains of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* are summarised in Table 5.

Quantitative results and percentage of susceptible strains for A. actinomycetemcomitans

In regards to *A. actinomycetemcomitans*, a total of 24 strains belonging to 22 patients were analysed. In the tested strains no resistance was detected against amoxicillin or amoxicillin and clavulanate. In the case of amoxicillin, MIC50 was 0.75 µg/mL and MIC 90 was 1.5 µg/mL. The corresponding values were 0.5 µg/mL and 1 µg/mL for amoxicillin and clavulanate. Conversely, 61.7% of *A. actinomycetemcomitans* strains were resistant to metronidazole; for this specific antimicrobial agent, MIC50 and MIC90 were 24 µg/mL and >64 µg/mL, respectively. Resistance to azithromycin could

be found in one third of the strains (28%), with MIC50 of 0.38 µg/mL and MIC90 of 24 µg/mL.

Quantitative results and percentage of susceptible strains for P. gingivalis

A total of 30 different strains of *P. gingivalis*, belonging to 29 different patients, were assessed. *P. gingivalis* demonstrated lower values of MIC50 and MIC90 and higher figures of percentage of susceptibility to the antimicrobial agents, when compared to *A. actinomycetemcomitans*; MIC50 was <0.016 µg/mL for amoxicillin, amoxicillin and clavulanate and metronidazole, and 0.19 µg/mL for azithromycin. MIC90 values were 0.064 µg/mL for amoxicillin, 0.032 µg/mL for amoxicillin and clavulanate, 0.047 µg/mL for metronidazole, and 1 µg/mL for azithromycin (figure 1). All *P.gingivalis* strains showed susceptibility against the four tested drugs.

Discussion

This study has shown that a sample of relatively young periodontitis patients in Morocco harboured a high prevalence of periodontal pathogens, being *A. actinomycetemcomitans* identified in 79.5% and *P. gingivalis* in 84.4%. *P. intermedia*, *T. forsythia* and *F. nucleatum* were also frequently found in this patient sample. When isolates of *P. gingivalis* were tested for antimicrobial susceptibility, all tested strains were susceptible to all tested antibiotics. However, one third of the *A. actinomycetemcomitans* strains demonstrated resistance towards azithromycin and 61.7% to metronidazole.

The reported prevalence of *A. actinomycetemcomitans* in Morocco has differed depending on the age of the study sample and the microbiological methodology used. In this investigation using culture *A. actinomycetemcomitans* was detected in 79.5% of the patients, with a mean age of 24.4, while Haubek et al. (2001) also reported high prevalence (60.4%) in patients younger than 19 [7]. In contrast, a recent study from our research group, has reported that 35.6% of the patients, with a mean age of 27.6, were positive for this pathogen [10]. Using polymerase chain reaction methods, the reported prevalence of *P. gingivalis* was higher in patients with severe chronic

periodontitis compared to those with aggressive periodontitis (53.3% and 37.5%, respectively) [29].

The E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) was used in this investigation to assess the antimicrobial susceptibility profiles of the isolated *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* strains, by determination of their respective MIC values [27]. The E-test has been frequently used to assess antimicrobial profiles in other geographical locations, mainly in Europe (The Netherlands, Switzerland and Spain), but also in Colombia or Iran [19, 22, 30, 31].

The obtained MIC₉₀ of *A. actinomycetemcomitans* for amoxicillin was 1.5 µg/mL, without presence of resistant strains. Similar results were reported in The Netherlands, in two different studies by the same group with 7 years of difference [22, 32]. These studies reported lower values of MIC₉₀ than in the present study (between 0.38 and 1µg/mL) and respective percentages of resistance between 0% and 4.3%. When these results are compared with those reported in Spain and Colombia studying the antimicrobial susceptibility of isolates from the same species, differences were bigger, with higher MIC₉₀ values (32 µg/mL) and higher percentages of resistant strains (33.3% and 77.7%, respectively) [19, 22]. These differences may be explained by the differences in the levels of antibiotic consumption, or may be a consequence of differences in the selected breakpoints.

All the tested strains of *A. actinomycetemcomitans* were susceptible to amoxicillin and clavulanic acid, in agreement with the very low MIC₉₀ values (0.5 -2µg/mL) reported in similar studies in The Netherlands, Switzerland or Colombia [19, 22, 30]; being the only exception a study in Spain reporting 10% of resistant strains [22].

In the present study, the MIC₉₀ for metronidazole was >64 µg/mL, which compares lower to what has been reported in Spain and Colombia [19, 22]. The percentage of resistant strains, however, was similar when comparing strains from Morocco and Spain (around 60%) [22], although lower than strains from Colombia (88.8%) [19]. Lower values of MIC₉₀ (64-128 µg/mL) have been reported in Northern Europe, with

percentages of the resistant isolates ranging between 20.8% and 27.8% [32]. These results indicate that the clinical efficacy of metronidazole, an antibiotic selectively aimed to strict anaerobic bacterial species has limited effectiveness against *A. actinomycetemcomitans* probably due to the facultative anaerobic nature of this bacterial strain.

Almost one third of the tested *A. actinomycetemcomitans* strains were resistant to azithromycin, a similar percentage to what was found in Spain [22]. Two different studies have described lower MIC90 values and no antimicrobial resistance to this antibiotic in The Netherlands [22, 32].

P. gingivalis showed complete sensitivity against amoxicillin in the Moroccan population, although MIC90 values were slightly higher when compared to The Netherlands or Spain, where also a high sensitivity towards this drug was reported [22, 32]. Differences in MIC90 values and percentages of resistant strains have been reported in Colombia or Iran, with higher MIC90 values for amoxicillin (>256 µg/mL and 1 µg/mL respectively), and percentages of resistance of 25.49% and 8%, respectively [19, 31]. Again, it is unclear whether these differences might be associated to differences in antibiotic consumption or differences in breakpoint selection.

No resistance of *P. gingivalis* strains for metronidazole were found in this investigation, in agreement with other studies assessing strains from Switzerland, Sweden, Spain or The Netherlands [22, 30, 33]. Conversely, strains from Colombia and Iran demonstrated higher levels of resistance [19, 31]. Similarly, no resistance in *P. gingivalis* isolates were identified towards azithromycin or amoxicillin and clavulanate in the present study, similarly what has been reported when studying isolates from Spain, The Netherlands, Switzerland, Colombia or Iran [19, 22, 30].

These results, however, should be interpreted with caution due to the clear limitations of this culture-based investigation as a method of bacterial detection. Moreover, this study was carried out in planktonic isolates, which may have different behaviour when studied within a biofilm, where it is well known that higher amounts of the

antimicrobial compound is required to have the same inhibitory effect and therefore, *in vitro* susceptibility testing does not necessarily indicate *in vivo* clinical efficacy. In addition, the use of different breakpoints for the various antibiotics used in different studies makes difficult the comparison among them.

Conclusion

A. actinomycetemcomitans and *P. gingivalis* were frequently isolated (79.5% and 84.4% respectively) in patients with periodontitis in Morocco. In these patients the isolated *P. gingivalis* strains were susceptible to all tested antimicrobials. In *A. actinomycetemcomitans* strains, however, antimicrobial resistance was observed to metronidazole and azithromycin.

Acknowledgments

We thank Itziar González and Ana O'Connor from the Laboratory of Dental Research, University Complutense, Madrid, for their technical assistance.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest: none.

No funding

REFERENCES

- [1] Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996;1:821-78.
- [2] Thomas RZ, Loos BG, Teeuw W, Kunnen A, van Winkelhoff AJ, Abbas F. [Periodontitis and systemic diseases: from science to clinical practice]. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2015;122:542-8.
- [3] Llambes F, Arias-Herrera S, Caffesse R. Relationship between diabetes and periodontal infection. *World J Diabetes*. 2015;6:927-35.
- [4] Ferreira MC, Dias-Pereira AC, Branco-de-Almeida LS, Martins CC, Paiva SM. Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. *J Periodontal Res*. 2017:n/a-n/a.
- [5] Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:78-111.
- [6] Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005;32:7-15.
- [7] Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res*. 2001;80:1580-3.
- [8] Haubek D, Ennibi OK, Vaeth M, Poulsen S, Poulsen K. Stability of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Dent Res*. 2009;88:856-60.
- [9] Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*. 2008;371:237-42.
- [10] Minguez M, Ennibi OK, Pousa X, Lakhdar L, Abdellaoui L, Sanchez M, et al. Characterization of *A. actinomycetemcomitans* strains in subgingival samples from periodontitis subjects in Morocco. *Clin Oral Investig*. 2016;20:1809-18.
- [11] Haffajee AD, Socransky SS, Dibart S, Kent RL. Response to periodontal therapy in patients with high or low levels of *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *R. nigrescens* and *B. forsythus*. *J Clin Periodontol*. 1996;23:336-45.
- [12] Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*. 1999;20:168-238.
- [13] Chahboun H, Arnau MM, Herrera D, Sanz M, Ennibi OK. Bacterial profile of aggressive periodontitis in Morocco: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2015;15:25.
- [14] Van der Velden U, Abbas F, Armand S, Loos BG, Timmerman MF, Van der Weijden GA, et al. Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol*. 2006;33:540-8.
- [15] Hirschfeld L, Wasserman B. A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol*. 1978;49:225-37.
- [16] Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol*. 1990;17:345-50.
- [17] Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:136-59; discussion 60-2.
- [18] Herrera D, Alonso B, Leon R, Roldan S, Sanz M. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol*. 2008;35:45-66.
- [19] Ardila CM, Granada MI, Guzman IC. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2010;45:557-63.

- [20] Herrera D, van Winkelhoff AJ, Dellemijn-Kippuw N, Winkel EG, Sanz M. Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *J Clin Periodontol*. 2000;27:520-5.
- [21] Van Winkelhoff AJ, Gonzales DH, Winkel EG, Dellemijn-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Sanz M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27:79-86.
- [22] Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol*. 2005;32:893-8.
- [23] Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4:1-6.
- [24] Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting Gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *J Periodontal Res*. 1991;26:308-13.
- [25] Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol*. 1972;24:638-44.
- [26] Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol*. 2001;39:509-13.
- [27] Nachnani S, Scuteri A, Newman MG, Avanesian AB, Lomeli SL. E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *J Periodontol*. 1992;63:576-83.
- [28] "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016." 2016.
- [29] Benrachadi L, Bouziane A, Azziman Z, Bouziane-Quartini F, Ennibi O. Screening for periodontopathogenic bacteria in severe chronic periodontitis in a Moroccan population. *Med Mal Infect*. 2012;42:599-602.
- [30] Kulik EM, Lenkeit K, Chenaux S, Meyer J. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:1087-91.
- [31] Japoni A, Vasin A, Noushadi S, Kiany F, Japoni S, Alborzi A. Antibacterial susceptibility patterns of *Porphyromonas gingivalis* isolated from chronic periodontitis patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16:e1031-5.
- [32] Veloo AC, Seme K, Raangs E, Rurenga P, Singadji Z, Wekema-Mulder G, et al. Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40:450-4.
- [33] Dahlen G, Preus HR. Low antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacteria in periodontitis 5 years following metronidazole therapy. *Anaerobe*. 2017;43:94-8.

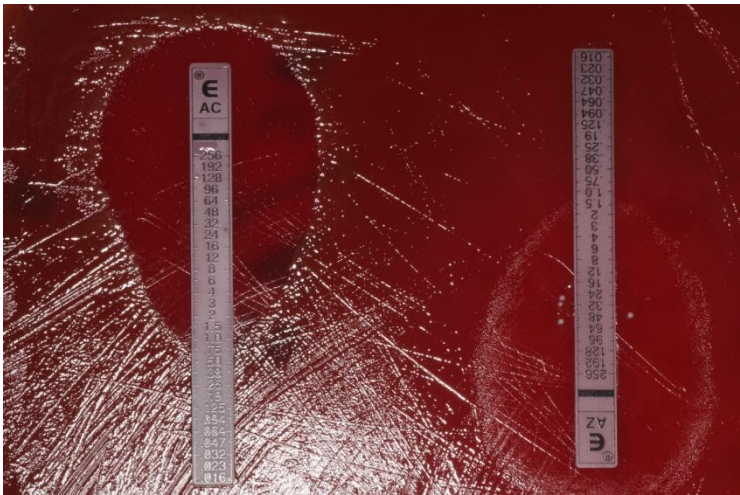


Fig. 1. Image showing MIC values for *P. gingivalis* strain using E-test in a blood agar plate. Minimum inhibitory concentration (MIC) was 0.75 mg/mL for amoxicillin and 1.5 mg/mL for azithromycin. AC, amoxicillin. AZ, azithromycin.

Table 1. Demographic features of the study population and for the specific patients providing strains of *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) or *P. gingivalis* (*Pg*).

		All	<i>Aa</i>	<i>Pg</i>
N		45	22	29
Age	Mean	24.4	23.8	25.7
	SD	6.3	6.1	6.3
	Maximum	35.0	35.0	35.0
	Minimum	13.0	13.0	15.0
Gender	Female	34	19	20
	Male	9	1	8
	Not available	2	2	1
Periodontitis	Chronic	13	7	10
	Aggressive	32	15	19

SD, standard deviation.

Table 2. Clinical characteristics of the selected population and for the specific patients providing strains of *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) or *P. gingivalis* (*Pg*).

	All		<i>Aa</i>		<i>Pg</i>	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
PPD	7.57	2.00	7.36	2.23	7.47	1.89
REC	0.53	0.81	0.63	1.00	0.41	0.57
CAL	8.10	2.31	7.99	2.54	7.88	2.17
BOP	98.3%	8.3%	96.6%	11.7%	100.0%	0.0%
PII	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%
SUP	14.4%	22.3%	15.9%	26.2%	14.7%	21.7%

SD, standard deviation.

PPD, probing pocket depth; REC, recession; CAL, clinical attachment level; BOP, bleeding on probing; PII, plaque index; SUP, suppuration.

Table 3. Microbiological characteristics of the selected population and for the specific patients providing strains of *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) or *P. gingivalis* (*Pg*): frequency of detection of different bacterial species.

	All	<i>Aa</i>	<i>Pg</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	79.5%	100.0%	67.9%
<i>P. gingivalis</i>	84.4%	68.2%	100.0%
<i>P. intermedia</i>	93.2%	90.9%	92.9%
<i>T. forsythia</i>	72.7%	59.1%	85.7%
<i>P. micra</i>	20.5%	22.7%	25.0%
<i>C. rectus</i>	18.2%	18.2%	21.4%
<i>F. nucleatum</i>	81.8%	86.4%	78.6%
<i>Capnocytophaga</i> spp.	36.4%	50.0%	25.0%

Table 4. Microbiological characteristics of the selected population and for the specific patients providing strains of *A. actinomycetemcomitans* (Aa) or *P. gingivalis* (Pg): colony forming units (CFU) and proportions of total counts.

COUNTS	All		Aa		Pg	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
logCFU	6.74	0.71	6.40	0.70	7.02	0.56
<i>A. actinomyc.</i>	3.82	2.34	4.64	1.36	3.41	2.65
<i>P. gingivalis</i>	5.11	2.41	3.91	2.83	6.30	0.90
<i>P. intermedia</i>	4.93	1.60	4.54	1.70	5.11	1.64
<i>T. forsythia</i>	4.07	2.64	3.09	2.76	4.85	2.22
<i>P. micra</i>	1.03	2.08	1.16	2.20	1.21	2.18
<i>C. rectus</i>	0.86	1.87	0.84	1.85	1.04	2.05
<i>F. nucleatum</i>	3.96	1.95	4.09	1.75	3.94	2.14
<i>Capnocytophaga</i> spp.	1.63	2.22	2.12	2.21	1.17	2.10

PROPORTIONS	mean	SD	mean	SD	mean	SD
<i>A. actinomyc.</i>	12.3%	36.6%	21.3%	51.7%	5.9%	13.8%
<i>P. gingivalis</i>	23.9%	22.7%	17.2%	22.0%	31.3%	21.0%
<i>P. intermedia</i>	6.1%	7.9%	5.8%	6.7%	5.6%	8.2%
<i>T. forsythia</i>	5.8%	8.9%	4.0%	7.5%	6.5%	9.2%
<i>P. micra</i>	0.8%	2.3%	0.7%	1.8%	0.8%	2.5%
<i>C. rectus</i>	0.1%	0.3%	0.2%	0.4%	0.1%	0.3%
<i>F. nucleatum</i>	2.1%	2.9%	3.1%	3.6%	1.2%	1.3%
<i>Capnocytophaga</i> spp.	0.9%	2.9%	1.5%	3.9%	0.3%	1.0%

SD, standard deviation.

logCFU, logarithm of total anaerobic CFU.

Table 5. Antimicrobial susceptibilities: evaluation of *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) and *P. gingivalis* (*Pg*) strains.

	n strains	range	MIC50	MIC90	R (%)	breakpoint	
						S≤/	R>
Amoxicillin							
<i>Aa</i>	47	0.25-2	0.75	1.5	0	0.5	2
<i>Pg</i>	70	<0.016-0.75	<0.016	0.064	0	0.5	2
Amoxicillin &Clavulanate							
<i>Aa</i>	46	0.032-1.5	0.5	1	0	4	8
<i>Pg</i>	73	<0.016-0.75	<0.016	0.032	0	4	8
Metronidazole							
<i>Aa</i>	47	0.19->64	24	>64	61.7	4	4
<i>Pg</i>	76	<0.016-0.094	<0.016	0.047	0	4	4
Azithromycin							
<i>Aa</i>	50	<0.047->24	0.38	24	28	2	2
<i>Pg</i>	73	<0.016-1.5	0.19	1	0	2	2

MIC, minimum inhibitory concentration. S, susceptible; R, resistant

Highlights:

- In a group of Moroccan patients with chronic or aggressive periodontitis, the prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* was 79.5% and 84.4%, respectively.
- *A. actinomycetemcomitans* showed susceptibility for amoxicillin and amoxicillin plus clavulanate, while 28% of the isolated strains were resistant to azithromycin and 61.7% towards metronidazole.
- No resistance towards amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, metronidazole and azithromycin was found for *P. gingivalis* in this Moroccan periodontitis patient cohort.

Authors' contributions

MM carried out acquisition of data, performed the antimicrobial susceptibility tests and drafted the manuscript. LL and AL carried out the acquisition of data. PP and MCS processed the samples. DH conceived of the study, participated in the design of the study and revised critically the manuscript. MS participated in the design of the study and its coordination. OKE took part in the coordination of the study, in the collection of the data, and revised critically the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Name: Prof. Pedro Diz

Professor Infectious Diseases, Dental Surgery, Oral and Maxillofacial Surgery at the Faculty of Medicine and Dentistry (University of de Santiago de Compostela).

Address: Calle Entrerríos s/n, 15782 Santiago de Compostela (Spain)

E-mail address: pedro.diz@usc.es

Name: Prof. Miguel Viñas

Professor of Microbiology at the Faculty of Medicine and Dentistry (University of Barcelona).

Address: Feixa larga s/n. 08907. L'hospitalet de Llobregat. Barcelona (Spain)

E-mail address: mvinyas@ub.edu

Name: Prof. Rebeca M^a del Mar Alonso

Professor of Microbiology at the Faculty of Chemistry (Complutense University of Madrid)

Address: Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040. Madrid

E-mail address: realonso@ucm.es

Name: Prof. Arie Jan van Winkelhoff

Professor at the Centre for Dentistry and Oral Hygiene, Faculty of Medical Sciences, at the University of Groningen in The Netherlands.

Address: Broer straat, 5. 9712, CP. Groningen. The Netherlands.

E-mail address: aj.vanwinkelhoff@vumc.nl

Name: Prof. Flavia Teles

Research Associate Professor at University of North Carolina at Chapel Hill.

Address: 103 South Building, 27599, Chapell Hill, North California, United States of America.

E-mail address: fteles@email.unc.edu

Name: Prof. Carlos Ardila

Research Associate Professor Epidemiology Group, University of Antioquia.

Address: Street, 64 No 52–59 Medellín, Colombia .

E-mail address: martinardila@gmail.com

VIII. DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la importancia de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis crónica y agresiva en España y Marruecos, estableciendo su prevalencia, su variabilidad genética y las implicaciones terapéuticas en el tratamiento de la periodontitis.

En el **primer artículo de este trabajo (Mínguez et al., 2014)**, la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* fue 5.7% en la cohorte de pacientes españoles analizada. No se encontró ninguna cepa con la delección característica del clon JP2. En la distribución de los serotipos, 33 de los 40 pacientes mostraron un único serotipo, entre los cuales predominaba el serotipo “b” (14 pacientes) y el “a” (10 pacientes). Por otro lado, el 65.8% de la muestra mostraron resultados positivos para la Cdt.

Respecto al **segundo artículo de este trabajo (Mínguez et al., 2016)**, el 35.6% del total de 59 pacientes mostraron cepas de *A. actinomycetemcomitans*. Estos pacientes mostraron bolsas periodontales más profundas y mayor proporción de *P. micra* (con diferencias estadísticamente significativas) respecto a los pacientes que no mostraron esta bacteria entre sus recuentos. Respecto a la distribución de los serotipos, el 94.1% de la población mostró un resultado positivo para el serotipo “b”, mientras en sólo un paciente se adivinó coinfección con los serotipos “a” y “e”. El 12.2% de los pacientes mostró la cepa altamente virulenta de *A. actinomycetemcomitans* (clon JP2) mientras que el 78% de los pacientes lo hicieron para la Cdt.

En el **tercer artículo de este trabajo (Chahboun et al., 2015)**, se detectaron las cepas de *A. actinomycetemcomitans* más frecuentemente y en mayores recuentos en el grupo de periodontitis agresiva generalizada comparado con el grupo de periodontitis crónica, con diferencias estadísticamente significativas; *P. gingivalis*, sin embargo, se encontró más frecuentemente y en mayores recuentos en aquellos pacientes diagnosticados de periodontitis agresiva generalizada comparado con el grupo de periodontitis crónica o con aquellos que padecían periodontitis agresiva localizada. *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *T. forsythia* se aislaron con elevada frecuencia en todos los grupos.

En el **cuarto artículo de este trabajo**, se observaron altos valores de prevalencia para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (79.5% y 84.4% respectivamente). El 100% de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* mostró susceptibilidad frente amoxicilina y amoxicilina y clavulánico, mientras 28% de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* fueron resistentes a la azitromicina y el 61.7% al metronidazol. No se encontró resistencia frente a ningún antimicrobiano en el caso de *P. gingivalis*.

Prevalencia de *A. actinomycetemcomitans*

Considerando de manera conjunta los resultados de los artículos que componen este trabajo, puede sugerirse que la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* varía significativamente entre dos países vecinos, como son España y Marruecos, con valores de 5.7% y 35.6%, respectivamente (Minguez et al., 2014; Minguez et al., 2016). La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* descrita en España coincide con artículos similares que han hallado frecuencias de detección de este periodonto-patógeno entre 3.2% y 6.3% (Sanz et al., 2000; Lau et al., 2004).

Sin embargo, en este trabajo la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* observada en Marruecos (35.6%) fue menor comparado con otros artículos como el de Haubek y cols. (2001) con valores de 60.4%; estas diferencias pueden explicarse por las distintas características demográficas (principalmente la edad) y la condición periodontal de los pacientes incluidos en cada artículo.

En relación con esto, existen determinados factores que pueden explicar la variabilidad en la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* y se detallan a continuación.

Factores que explican la variabilidad en la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans*

Las diferencias evidentes en cuanto a la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* entre distintos países podrían deberse, principalmente, a la variabilidad en la prevalencia de periodontitis entre las diferentes etnias o localizaciones geográficas o al método utilizado para su detección (Rylev y Kilian, 2008).

Prevalencia de periodontitis según la etnia y la localización geográfica

Los resultados del presente trabajo revelaron una prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* de 5.7% en España, mientras en Marruecos la prevalencia de este periodontopatógeno hallada en esta investigación fue de 35.6%.

Uno de los factores que podría explicar esta variabilidad entre España y Marruecos es la diferencia en la prevalencia de periodontitis, principalmente agresiva, descrita en ambos países y que está relacionada con la presencia de *A. actinomycetemcomitans* (Henderson et al., 2010). La prevalencia de la periodontitis agresiva ha demostrado ser particularmente elevada (7.6%) en los adolescentes que residen o proceden de la región oeste del continente africano, incluyendo árabes y bereberes (Haubek et al., 2001; Rylev y Kilian, 2008) frente a valores menores de prevalencia en países del este de África (Baelum et al., 1997) o frecuencias de detección por debajo del 1% en pacientes de raza caucásica (Brown et al., 1996).

Existen distintas hipótesis que explican la alta prevalencia de periodontitis agresiva en estas regiones. A nivel del sujeto, podría explicarse por las diferencias en el estatus socioeconómico de los pacientes, reflejado en los cuidados dentales, visitas al odontólogo y atención a la higiene oral; por otro lado, es evidente que existen diferencias en la susceptibilidad genética de los sujetos, lo que explicaría la tendencia a la agregación familiar de casos en este tipo de periodontitis. A nivel de los perfiles microbiológicos característicos de la periodontitis agresiva, se ha observado que existen variaciones en la virulencia y en la capacidad patogénica de *A. actinomycetemcomitans* en la región del norte de África, apartado que se desarrollará más adelante.

Respecto a la prevalencia de la periodontitis crónica, no se han detectado diferencias significativas entre distintos grupos étnicos (Rylev y Kilian, 2008; Van der Velden et al., 2006).

Prevalencia de A. actinomycetemcomitans según el método utilizado para su detección

En el primer artículo de este trabajo (Minguez et al., 2014) se halló, mediante cultivo, que la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en España era de 5.7%; valores similares (6.3%) encontraron Lau y cols. en el año 2004, utilizando la misma metodología. Sanz y cols. en el año 2000 describieron, también en España y mediante cultivo en agar soja de tripticasa y suero con bacitracina y vancomicina (TSBV), que la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* era de 3.2%. En el mismo artículo, la prevalencia de este periodonto-patógeno en la misma población resultó ser de 18.8% cuando se utilizó la PCR.

En otras áreas geográficas, cuando se utiliza el cultivo los porcentajes de prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* no superan el 20% (Kim et al., 2009; Ogunsalu et al., 2011) en poblaciones muy diversas pertenecientes a países como Alemania o Jamaica. La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* ronda entre 19% y 54.4% cuando se utiliza la PCR en países como Ghana, Haití, Brasil, Tailandia u otros países europeos como Grecia y Alemania, así como en Estados Unidos (Aberg et al., 2012; Chen et al., 2010; Psoter et al., 2011; Bandhaya et al., 2012; Sakellari et al., 2011; Roman-Torres et al., 2010; Kim et al., 2009)

Los valores más altos de prevalencia de este periodonto-patógeno (83%-93%) se han hallado mediante la técnica de hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez en países como China y Tailandia (Papapanou et al., 1997; Papapanou, 2002).

La interpretación de la comparación de la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* entre distintos países es complicada debido a las diferencias en los límites de detección de las especies bacterianas en cada uno de los métodos empleados; en el caso del cultivo o la técnica de hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez es de 10^3 - 10^4 células bacterianas y 25-100 células bacterianas en el caso de la PCR (Socransky y Haffajee, 1992; Sanz et al., 2004).

a) Medio de cultivo de *A. actinomycetemcomitans*

Respecto a la metodología utilizada para la detección de *A. actinomycetemcomitans*, en los artículos que componen este trabajo se utilizó el medio de cultivo Dentaïd 1, que se trata de infusión de agar compuesto de extracto de cerebro y corazón (*Brain Heart Infusion Agar*) (Alsina et al., 2001); otros artículos realizados en nuestro país han utilizado medios de cultivo diferentes, como TSBV y reportaron frecuencias de detección de 3.2% (Sanz et al., 2000). Un artículo comparó tres medios de cultivo específicos para la detección de *A. actinomycetemcomitans*, TSBV, Dentaïd 1 y Dentaïd 1 modificado, la diferencia entre los dos últimos es que en el segundo se ha sustituido el agar por el caldo de cultivo. Los resultados de este artículo defienden la utilización del medio de cultivo Dentaïd 1 ya que se demostraron tasas de recuperación de unidades formadoras de colonias de *A. actinomycetemcomitans* mayores cuando se compara con el medio TSBV (Rurenga et al., 2013).

b) Técnica de toma de muestra de placa subgingival

Mombelli y cols. en el año 1991, demostraron que la técnica de toma de muestras más eficaz para la detección de periodonto-patógenos (en concreto de *P. gingivalis*) era seleccionar, por cuadrante, la bolsa periodontal más profunda con sangrado, particularmente en molares (Mombelli et al., 1991); dichas muestras obtenidas con puntas de papel pueden agruparse y analizarse de manera simultánea o hacer el análisis de cada punta por separado. En los artículos que componen el presente trabajo las puntas de papel se agruparon en un mismo vial y así fueron analizadas. Schacher y cols. en el año 2007, compararon ambas modalidades y concluyeron que agrupar las puntas de papel en un mismo vial aumenta los niveles obtenidos de recuentos de periodonto-patógenos, aunque sin diferencias estadísticamente significativas para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (Schacher et al., 2007).

***A. actinomycescomitans* y su relación con la afectación de los tejidos periodontales**

En el segundo artículo de este trabajo (Minguez et al., 2016) se observó una clara relación entre la presencia de *A. actinomycescomitans* y la mayor afectación periodontal, reflejado en un número significativamente mayor de bolsas periodontales profundas y una composición más patogénica del biofilm subgingival en dichos pacientes, con mayores proporciones de *P. micra*. En paralelo, otros artículos anteriores han relacionado la presencia de *A. actinomycescomitans* con una mayor extensión o severidad de la enfermedad periodontal o incluso con el diagnóstico de periodontitis agresiva (Elamin et al., 2011; Aberg et al., 2012).

Variabilidad genética de *A. actinomycescomitans*

Parece claro, por todo lo comentado anteriormente, que *A. actinomycescomitans* juega un papel fundamental en la aparición y progresión de la periodontitis, especialmente de su forma agresiva, y esto es evidente ya que artículos clásicos han determinado que existe una correlación entre la presencia y los recuentos de este microorganismo y la presencia y severidad de la periodontitis (Haffajee y Socransky, 1994). Por otro lado, se ha detectado peor respuesta al tratamiento cuando esta especie bacteriana persiste tras el tratamiento convencional de la periodontitis, el raspado y alisado radicular (Renvert et al., 1990).

Además, *A. actinomycescomitans* también ha sido aislado en pacientes con periodonto sano, lo que hace pensar que o no todos los sujetos son igualmente susceptibles a la infección por esta bacteria o existen variaciones en la virulencia y en el potencial patogénico de la misma. A continuación se detalla la distribución de los serotipos de *A. actinomycescomitans*, según la población analizada, así como su caracterización en términos de factores de virulencia.

Distribución de los serotipos de *A. actinomycescomitans*

De acuerdo a una proteína capsular específica en la estructura de *A. actinomycescomitans*, se han identificado seis serotipos distintos, del “a” al “f”, los

cuales provocan una respuesta inmune humoral diferente en el sujeto. No se ha podido determinar hasta ahora que el antígeno del serotipo sea un determinante de virulencia de por sí (Rylev y Kilian, 2008).

En relación con los serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, en el primer y segundo artículo que componen el presente trabajo, se diferencian dos patrones de distribución de los serotipos casi opuestos. Mientras en la muestra de pacientes españoles analizada (Minguez et al., 2014), el 75% de los pacientes presentaban un único serotipo y el 17.5% de los pacientes mostraban coinfección por serotipos distintos, en el caso de la población marroquí, el 94.1% de la población marroquí mostró un único serotipo y sólo un 5.9% de la población mostraba coinfección por dos serotipos distintos (Minguez et al., 2016). La coinfección por varios serotipos distintos no es un hallazgo casual, ya que Yoshida y cols. en el año 2003, encontraron, en el 33% de las localizaciones analizadas de pacientes con periodontitis en Japón, dos o incluso tres serotipos distintos de *A. actinomycetemcomitans* (Yoshida et al., 2003). No obstante, lo más habitual es que cada individuo esté infectado por un único serotipo y que éste permanezca estable durante años (Saarela et al., 1992).

Analizando la presencia de cada uno de los serotipos, en la muestra de pacientes españoles analizada en el primer artículo de este trabajo (Minguez et al., 2014), el 35% de los pacientes mostraban monoinfección por el serotipo “b”, 25% por el serotipo “a”, 10% por el serotipo “c” y el 5% de los pacientes mostraban el serotipo “d”. El 7.5% de los pacientes con coinfección eran positivos para los serotipos “a y b”, 5% para “a y c”, y 2.5% para “b y c” y “c y d”.

Sin embargo, en la población marroquí analizada (Minguez et al., 2016) el 94.1% de los pacientes mostraron infección por el serotipo “b”. Existen claras diferencias respecto a un artículo que analizó la distribución de los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* en una población marroquí con periodontitis agresiva (Haubek et al., 2001) y encontró que el 77% mostraban el serotipo “a”, diferencias que podrían explicarse una vez más por la distinta metodología utilizada, PCR en el caso de nuestro artículo y mediante inmunodiagnóstico en el caso del artículo del grupo de investigación danés.

Además de la metodología utilizada para su detección, la sorprendente diferencia en la distribución de los serotipos entre España y Marruecos puede explicarse por la influencia de la etnia o de la localización geográfica y también por la distinta condición periodontal que presente el paciente.

a) Distribución de serotipos según la etnia y la localización geográfica

La literatura es abundante a este respecto; en Europa (Finlandia, Suecia y Dinamarca), parece que la presencia de los serotipos “a”, “b” y “c” es predominante y en proporciones similares (Saarela et al., 1992; Haubek et al., 1997) mientras en Asia (Japón, China, Vietnam) es más frecuente el serotipo “c” (Mombelli et al., 1999; Thiha et al., 2007; Yoshida et al., 2003; Tan et al., 2001; Holtta et al., 1994) así como en Ghana (Aberg et al., 2013). En estados Unidos se ha descrito la presencia de los serotipos “b” y “c” (Chen et al., 2010) dependiendo de la condición periodontal del sujeto.

b) Distribución de serotipos según la condición periodontal del paciente

En la muestra de pacientes españoles analizada (Minguez et al., 2014), los pacientes con periodontitis refractaria mostraron una clara predominancia del serotipo “b” (como monoinfección en el 50% de los casos o combinado con el serotipo “a” en el 25 % de los pacientes), los pacientes con periodontitis refractaria también mostraron coinfección por varios serotipos en el 37.5% de los casos. Los pacientes con periodontitis agresiva presentaron, en un 46.2% de los casos, el serotipo “b” y en un 38.5% el serotipo “a”. El 7.7% de los pacientes eran positivos para los serotipos “a y b”, conjuntamente.

En el caso de la periodontitis crónica, el patrón era más heterogéneo con valores similares (15.8%-26.3%) para los serotipos “a”, “b”, “c” y para la coinfección por varios serotipos. No existe en la literatura consenso en cuanto a la distribución de los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* en salud periodontal, así, Sakallari y cols. en el año 2011, observaron una mayor prevalencia del serotipo “c” en pacientes con periodontitis no tratada o en aquellos que habían sido tratados y seguían el programa de mantenimiento en Grecia. En una población finlandesa, se relacionó el serotipo “b”

con casos de periodontitis y el “c” en pacientes con salud periodontal (Asikainen et al., 1991). Fuera del continente europeo, en Japón se encontró una relación entre las localizaciones con afectación periodontal y el serotipo “c” (Yoshida et al., 2003).

Respecto a la distribución de los serotipos según el diagnóstico de periodontitis crónica o agresiva, la literatura disponible tampoco muestra una distribución clara de los distintos serotipos, de esta manera, parece que en la periodontitis crónica pueda haber una predominancia del serotipo “c” en Brasil (Teixeira et al., 2006). Respecto a la periodontitis agresiva, se observa predominancia del serotipo “b” en Estados Unidos y de los serotipos “a” y “c” en Turquía (Celenligil y Ebersole, 1998). En Alemania, es más frecuente la colonización por los serotipos “b” y “c” en periodontitis agresiva comparado con crónica (Jentsch et al., 2012).

Sí existe consenso en la literatura respecto a la menor frecuencia de detección de los serotipos “d” y “e” (Mombelli et al., 1999; Teixeira et al., 2006). En el primer artículo de este trabajo (Minguez et al., 2014), sólo un 5% de la población española analizada mostró infección por el serotipo “d”.

Respecto a la distribución de los serotipos en la población marroquí, en el segundo artículo de este trabajo, el 94.1% de los pacientes marroquíes mostraron infección por el serotipo “b”, sin hacer distinción entre tipo de periodontitis. Haubek y cols. en el año 2001, hallaron en el 77% de los pacientes con periodontitis agresiva la presencia del serotipo “a”, 11% de los pacientes presentaban el serotipo “c” y en el 5.5% la presencia del serotipo “d”. Estas claras diferencias en la distribución de serotipos pueden deberse a la distinta metodología utilizada entre artículos.

En definitiva, la correlación entre los distintos serotipos y la condición periodontal es, aun a día de hoy, controvertida, y varía sustancialmente según la población analizada (Brigido et al., 2014).

Distribución del gen operón de la leucotoxina de A. actinomycetemcomitans

En el presente trabajo, no se detectó ninguna cepa de pacientes españoles con la delección en la región promotora del gen de la leucotoxina característica del clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans*. En la población marroquí, sin embargo, el 11.8% de los

pacientes dieron un resultado positivo para dicha cepa; dichos pacientes eran mujeres diagnosticadas de periodontitis agresiva, y la profundidad de sondaje media era mayor comparado con el resto de los pacientes positivos para el genotipo de *A. actinomycetemcomitans* libre de la delección, y por lo tanto, con menor capacidad virulenta. Las cepas positivas para el clon JP2 pertenecían al serotipo “b” y mostraron también un resultado positivo para la Cdt.

Los datos hallados en esta investigación coinciden con lo publicado en la literatura; el clon JP2 afecta fundamentalmente a la población africana; prueba de ello es que en un estudio realizado por el grupo de Haubek y cols. en el año 2001, el 14.5% de los pacientes (cuya edad oscilaba entre 14 y 19 años) mostraron resultado positivo para el clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans*. Siete años después, en 2008, el mismo grupo de investigación demostró, en un estudio longitudinal, que la infección por el clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans* suponía un riesgo aumentado de sufrir una futura pérdida de inserción (riesgo relativo 18); de manera que el clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans* se definió como un agente etiológico importante de la periodontitis en la población joven marroquí (Haubek et al., 2008).

En un artículo en el que se utilizó la PCR para la detección de *A. actinomycetemcomitans* en una población marroquí (menor de 35 años), se detectó una prevalencia de 77% de infección por la leucotoxina altamente virulenta, que se encontró más frecuentemente en el grupo de periodontitis agresiva localizada (83%) que en el de generalizada (69%) (Ennibi et al., 2012). La prevalencia del clon JP2 fue de 8.8% en un grupo de 500 adolescentes en otros países africanos, como Ghana (Aberg et al., 2012).

Fuera del continente africano, y coincidiendo con la ausencia del clon JP2 en España (Minguez et al., 2014) tampoco se ha encontrado en otros países como Tailandia (Bandhaya et al., 2012) o Grecia (Sakellari et al., 2011) lo que demuestra que este clon está fuertemente asociado con periodontitis agresiva en sujetos cuyos ancestros se remontan al Mediterráneo o la región del oeste de África (Rylev y Kilian, 2008). Los casos limitados de infección por el clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes caucásicos descritos en Suecia (Claesson et al., 2011) y en Cerdeña (Orru et al., 2006)

probablemente reflejan la consecuencia de la inmigración de poblaciones del norte de África. En paralelo a los hallazgos respecto al clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans*, un artículo reciente comparó dos poblaciones, afro-brasileñas y no afro-brasileña y, ajustando para varios factores de confusión, los descendientes afro-brasileños mostraron mayores niveles de *A. actinomycetemcomitans*, además de mayor colonización por el clon JP2 serotipo “b” (de Araujo Neris et al., 2015).

Genotipo Cdt de *A. actinomycetemcomitans*

La expresión de la toxina citolítica (Cdt) de *A. actinomycetemcomitans* es otra propiedad potencialmente importante de esta bacteria ya que le confiere una virulencia aumentada; la incidencia de la expresión de dicha toxina, como se desarrollará a continuación, es altamente variable.

En España (Minguez et al., 2014), el 65.8% de las muestras presentaron el operón que codifica para la Cdt. Comparando con lo publicado, en Alemania, se halló la expresión de dicha toxina en un 45.5% en pacientes con periodontitis crónica (Jentsch et al., 2012). Fabris y cols. en el año 2002, en una muestra de aislados de *A. actinomycetemcomitans* procedentes de distintos países (Brasil, Kenia, Japón y Suecia) hallaron la presencia de los tres genes (*cdtA*, *cdtB* y *cdtC*) que codifican para la expresión de esta toxina en 34 de 40 cepas mediante PCR, y encontraron además, la ausencia de la actividad citolítica en una cepa de *A. actinomycetemcomitans* en la que no se detectaron los genes *cdtA* y *cdtB* (Fabris et al., 2002).

En cuanto a la distribución de Cdt según el diagnóstico de periodontitis, en la muestra de pacientes españoles analizada, el 66.67% de los pacientes con periodontitis crónica mostraban resultado positivo para la toxina Cdt. En el caso de la periodontitis agresiva, casi la mitad de los pacientes lo mostraban, y un 30% de los pacientes mostraban simultáneamente cepas de *A. actinomycetemcomitans* Cdt positivas y Cdt negativas. No se observó en ninguna cepa de resultado negativo para la toxina Cdt en el caso de los pacientes con periodontitis “refractaria”. Un artículo publicado en Alemania encontró mayor número de muestras de *A. actinomycetemcomitans* Cdt positivas en pacientes con periodontitis agresiva que en pacientes con periodontitis crónica (Jentsch et al., 2012); sin embargo, otro artículo no encontró diferencias respecto a la

toxina Cdt en los pacientes con periodontitis crónica o agresiva en China (Leung et al., 2005).

Respecto a la distribución de la Cdt en relación con los serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, en la población de pacientes españoles analizada (Minguez et al., 2014), el 83.3% de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* serotipo “a” eran Cdt positivas, y 66.7% en el caso de aquellas cepas positivas para el serotipo “c”.

En el artículo de Jentsch y cols. en el año 2012, se encontró además una relación entre las muestras Cdt positivas y el serotipo “b”; esa misma publicación no encontró relación entre cepas Cdt positivas y el serotipo “d”, lo que podría explicar una menor virulencia de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* con dicho serotipo; sin embargo, en nuestro artículo, el 50% de las cepas que mostraban el serotipo “d” fueron Cdt positivas.

En Marruecos (Minguez et al., 2016) el 64.7 % de los pacientes fueron caracterizados como Cdt positivos, y todos ellos, excepto un paciente, presentaban el serotipo “b”. 78% del total de cepas de *A. actinomycetemcomitans* analizadas en este artículo, mostraron resultados Cdt positivos. En Ghana, un estudio que analizó muestras de 200 adolescentes halló una frecuencia de detección de la Cdt de 79%, aunque no se demostró ninguna relación con la progresión de la periodontitis (Aberg et al., 2013).

La distribución de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* con actividad Cdt varía sustancialmente entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, en la población marroquí analizada (Minguez et al., 2016), tanto las cepas positivas y negativas para los genes de la toxina Cdt, eran serotipo “b”, lo cual no es de extrañar ya que el 95.1% de las muestras eran serotipo “b”. En el artículo de Aberg y cols. (2013), la distribución era más heterogénea, ya que un 13.6% de las muestras de *A. actinomycetemcomitans* serotipo “a” eran Cdt negativas y un 33.7% en el caso del serotipo “c”; para los serotipos “b” y “d”, todas las muestras demostraron actividad Cdt.

En definitiva, a pesar de que se ha detectado una mayor citotoxicidad en las cepas que presentan este gen, se necesitan más estudios para aclarar la relación descrita entre la

actividad de esta toxina, la distribución entre las distintas poblaciones y la condición periodontal de cada sujeto en particular.

Prevalencia de *P. gingivalis*

En el tercer artículo de este trabajo (Chahboun et al., 2015) la prevalencia de *P. gingivalis* fue significativamente mayor en el grupo de periodontitis agresiva que en el grupo de periodontitis crónica (82% y 60%, respectivamente). La literatura disponible respecto a la prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes marroquíes es escasa, sin embargo, un artículo preliminar sobre una muestra de 20 pacientes marroquíes con periodontitis agresiva detectó, mediante cultivo, una prevalencia del 30% (Chahbouni et al., 2013).

Fuera de las fronteras marroquíes, y coincidiendo con los resultados descritos por Chahboun y cols. en el año 2015, la prevalencia de *P. gingivalis* fue mayor en periodontitis agresiva comparado con periodontitis crónica utilizando la misma metodología en Chile, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Gajardo et al., 2005).

En cuanto a la distribución de *P. gingivalis* en distintas formas de periodontitis agresiva, la publicación de Chahboun y cols. en el año 2015 encontró mayor prevalencia en periodontitis agresiva generalizada que en su forma localizada (89.2% y 61.5%, respectivamente), datos que coinciden con lo publicado por un estudio llevado a cabo en Chile donde la prevalencia de *P. gingivalis* fue de 80% en periodontitis agresiva generalizada y 66% en periodontitis agresiva localizada (Lopez et al., 1995).

Perfiles microbiológicos como marcadores diagnósticos de periodontitis crónica y agresiva

La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* varía significativamente también según la condición periodontal del paciente, prueba de ello es que en el tercer artículo de este trabajo (Chahboun et al., 2015) se observó una prevalencia de *A.*

actinomycescomitans del 25% en pacientes marroquíes con periodontitis crónica y del 60% en el grupo de periodontitis agresiva mediante cultivo.

Un artículo anterior sobre una población marroquí, encontró, utilizando la PCR, una frecuencia de detección de *A. actinomycescomitans* de 13% en aquellos pacientes que presentaban una periodontitis crónica avanzada y de 37.5% en pacientes con periodontitis agresiva avanzada (Benrachadi et al., 2012); a pesar de las evidentes diferencias entre los artículos, que podrían justificarse dada la distinta metodología utilizada, en ambos artículos la prevalencia de *A. actinomycescomitans* era mayor en el grupo de periodontitis agresiva comparado con el de periodontitis crónica, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. De ahí surge la cuestión de si sería factible hacer un diagnóstico de periodontitis agresiva basado en la presencia de *A. actinomycescomitans*.

A este respecto, las limitaciones de los test que evalúan la presencia de *A. actinomycescomitans* y *P. gingivalis* para discriminar entre un diagnóstico de periodontitis crónica y agresiva han sido ampliamente descritos en distintos artículos (Mombelli et al., 2002; Stingu et al., 2012; Corraini et al., 2013); la literatura que apoya esta hipótesis es contundente, independientemente del método de detección utilizado y de la procedencia geográfica de la muestra estudiada, PCR en Japoneses o hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez en México y Brasil (Ximenez-Fyvie et al., 2006; Heller et al., 2012).

Sin embargo, la distribución de *A. actinomycescomitans* en los distintos grupos de periodontitis hallada en el tercer artículo de este trabajo (Chahboun et al., 2015) coincide con un artículo anterior en el que se observó que *A. actinomycescomitans* se hallaba más frecuentemente en periodontitis agresiva que en crónica y esta diferencia era estadísticamente significativa cuando se analizaba las puntas de papel por separado, no así en el caso de hacerlo con muestras agrupadas (Schacher et al., 2007).

En pacientes asiáticos, dos artículos (Yang et al., 2005; Thiha et al., 2007) observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de detección de *A. actinomycescomitans*, siendo mayor en periodontitis agresiva que en crónica, sin

embargo el método de detección utilizado (inmunofluorescencia y PCR, respectivamente) implica que no sean directamente comparables con los resultados obtenidos en los artículos que componen este trabajo.

Respecto a la distribución de *P. gingivalis* en las distintas formas de periodontitis, en el artículo de Chahboun y cols. en el año 2015, *P. gingivalis* se detectó con más frecuencia en pacientes con periodontitis agresiva generalizada (89.2%) que en aquellos con periodontitis agresiva localizada (61.5%) o crónica (60%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas, lo que coincide con la distribución de este periodonto-patógeno en países como Chile (Gajardo et al., 2005), Colombia (Botero et al., 2007) o Brasil (Faveri et al., 2009). El artículo de Schacher y cols. en el año 2007, sin embargo, encontró mayor frecuencia de detección de *P. gingivalis* en periodontitis crónica que en agresiva.

Esto demuestra que, aunque hasta el momento no se ha podido determinar que un perfil microbiológico específico se pueda utilizar para realizar un diagnóstico diferencial entre periodontitis crónica y agresiva, sí parece que pueda haber una relación entre la presencia *A. actinomycetemcomitans* y el diagnóstico de periodontitis agresiva. Un artículo publicado en 2014 coincide en sugerir, de manera preliminar, que la presencia de un consorcio a nivel microbiológico que combine *A. actinomycetemcomitans* con otros periodonto-patógenos podría ser de utilidad para discriminar entre la periodontitis agresiva y crónica (Lourenco et al., 2014). En el caso de *P. gingivalis*, por el contrario, no se observa tal tendencia.

Dentro de la periodontitis agresiva, y dependiendo de la extensión de las profundidades de sondaje y niveles de inserción clínica, se puede diferenciar una periodontitis agresiva localizada o generalizada, dependiendo del número de las localizaciones afectadas (menor o mayor del 30%).

En el tercer artículo del presente trabajo se encontró que la frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* no mostraba diferencias significativas en el grupo de periodontitis agresiva generalizada (64.2%) comparado con el de periodontitis agresiva localizada (46.2%). Al contrario de lo que ocurre en el artículo de Ennibi y cols. en el año 2012, en el cual, utilizando PCR como método de detección, se hallaron diferencias

estadísticamente significativas en cuanto a la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans*, mostrando mayor frecuencia de detección en el grupo de periodontitis agresiva localizada comparado con la periodontitis generalizada.

Estas diferencias podrían explicarse por el tamaño muestral de los artículos y por la diferente metodología en cuanto a la técnica de detección de los periodontopatógenos (Ennibi et al., 2012).

Resistencias bacterianas in vitro en pacientes con periodontitis en Marruecos

En el cuarto artículo del presente trabajo, se analizó la susceptibilidad de cepas de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* de pacientes con periodontitis crónica y agresiva en Marruecos frente a distintos antibióticos: amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulánico, metronidazol y azitromicina mediante el test Epsilométrico (E-test®).

Solamente un 61.7% de las muestras de *A. actinomycetemcomitans* mostraron resistencia frente al metronidazol y un tercio de las mismas frente a la azitromicina. En el caso de la amoxicilina y la amoxicilina combinada con ácido clavulánico, tanto las cepas de *A. actinomycetemcomitans* como las de *P. gingivalis* fueron susceptibles, así como las cepas de *P. gingivalis* para el resto de antibióticos testados.

Resistencias bacterianas de cepas de *A. actinomycetemcomitans*

La resistencia de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* evaluada mediante el test Epsilométrico (E-test®) frente a la amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulánico, metronidazol y azitromicina ha sido estudiada en poblaciones como Holanda (Van Winkelhoff et al., 2005; Veloo et al., 2012), Colombia (Ardila et al., 2010), Suiza (Kulik et al., 2008) y España (Van Winkelhoff et al., 2005).

Los resultados obtenidos en nuestra población marroquí respecto a la amoxicilina (MIC₉₀ 1.5 µg/ml y ausencia de cepas resistentes), son similares a los obtenidos en dos artículos que analizaron una población holandesa y obtuvieron tasas de resistencia frente a la amoxicilina de 0% y 4.3%, respectivamente (Van Winkelhoff et al., 2005; Veloo et al., 2012). Otros países como España y Colombia han mostrado porcentajes

de resistencia mayores (33.3% y 77.7%, respectivamente) frente a este antibiótico (Van Winkelhoff et al., 2005; Ardila et al., 2010), posiblemente por las diferentes tasas de consumo de los antibióticos o los distintos “puntos de corte” utilizados en los artículos, lo cual limita la comparación entre ellos.

El 100% de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* de los pacientes marroquíes mostraron susceptibilidad frente a la amoxicilina y ácido clavulánico, lo que coincide con lo observado en otros países como Holanda, Suiza y Colombia (Van Winkelhoff et al., 2005; Kulik et al., 2008; Ardila et al., 2010).

El metronidazol ha demostrado una efectividad limitada frente a la inhibición del crecimiento de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* en Marruecos, siendo el 61.7% de las muestras resistentes a dicho antibiótico. Estos niveles son comparables a lo obtenido en España (60%) (Van Winkelhoff et al., 2005) y menores de las resistencias observadas en Colombia (88.8%) (Ardila et al., 2010). La justificación de estos resultados parece tener que ver con la naturaleza anaerobia facultativa de esta especie bacteriana.

Cuando se compara la resistencia de *A. actinomycetemcomitans* frente a la azitromicina obtenida en Marruecos (un tercio de las cepas) se encuentran valores similares en España (33.3%) frente a la ausencia de cepas resistentes en Holanda (Van Winkelhoff et al., 2005).

Resistencias bacterianas de cepas de P. gingivalis

P. gingivalis mostró total sensibilidad frente a los antibióticos analizados en la población marroquí estudiada. En el caso de la amoxicilina, el 100% de las muestras analizadas fueron susceptibles, lo que coincide con lo obtenido en España y Holanda (Van Winkelhoff et al., 2005); las diferencias metodológicas de los artículos y las distintas políticas de consumo de antibióticos entre países puede explicar que en Colombia o Irán, existan cepas resistentes frente a este antibiótico (25.49% y 8%, respectivamente) (Ardila et al., 2010; Japoni et al., 2011).

Los pacientes marroquíes no mostraron resistencia frente a la amoxicilina y ácido clavulánico o frente a la azitromicina, resultados similares se observan en países como

España y Holanda (Van Winkelhoff et al., 2005), Suiza (Kulik et al., 2008), Colombia (Ardila et al., 2010) o Irán (Japoni et al., 2011).

Todas las cepas de *P. gingivalis* en la población marroquí fueron susceptibles frente al metronidazol, lo que coincide con el comportamiento de esta bacteria frente al mismo antibiótico en Europa (Van Winkelhoff et al., 2005; Kulik et al., 2008; Dahlen y Preus, 2017). Sin embargo, el 6% de las cepas de *P. gingivalis* mostraron resistencia frente a este antibiótico en Irán (Japoni et al., 2011) y el 21.56% en el caso de la población colombiana (Ardila et al., 2010).

Puntos fuertes de los artículos realizados

Todas las muestras de biofilm subgingival incluidas en este trabajo han sido analizadas en el Laboratorio de Microbiología de la facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, de manera que los protocolos estandarizados limitan los posibles errores en el procesamiento de las muestras y facilitan el análisis y la comparación conjunta de los resultados. La recogida de las muestras de los pacientes marroquíes y su transporte al laboratorio donde fueron procesadas se llevó a cabo en un plazo máximo de 36 horas, lo cual aseguraba la viabilidad de la muestra recogida. Los criterios de inclusión de los participantes en estos estudios fueron estrictos con el objetivo de conseguir la muestra de pacientes más homogénea posible.

Limitaciones de los artículos realizados

El limitado tamaño de la muestra de pacientes incluidos en cada estudio es una de las principales limitaciones de este trabajo. Dicha muestra tenía naturaleza de conveniencia, es decir, se trataba de pacientes que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid o a la Universidad Mohammed V de Rabat para solicitar tratamiento odontológico. En estos pacientes, el diagnóstico de periodontitis se dio, aun siguiendo la misma clasificación (Armitage, 1999), por distintos profesionales, lo cual puede añadir cierto error en la estratificación de los pacientes por grupos de periodontitis.

Respecto a la metodología, en el primer y segundo artículo (Minguez et al., 2014; Minguez et al., 2016) algunos de los pacientes sólo aportaban una cepa de *A. actinomycetemcomitans*, por lo que no fue posible determinar la presencia de varios serotipos distintos en estos pacientes, por ello, los resultados de coinfección por varios serotipos deben interpretarse con cautela. Además, los cebadores para el serotipo “e” fueron descritos posteriormente al análisis de nuestras muestras (van der Reijden et al., 2010), por lo que no se incluyó la posibilidad de detectar dicho serotipo en nuestros análisis.

En el cuarto artículo de este trabajo se evalúan las susceptibilidades de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* a cuatro antibióticos *in vitro*; es importante considerar que el comportamiento de las especies bacterianas estudiadas varía en su forma planctónica o incluidas en un biofilm, por lo que la relevancia clínica de los resultados obtenidos ha de interpretarse con criterio. Además, cuando los resultados de los análisis de susceptibilidades son comparados con lo publicado en la literatura, no existe unanimidad en los diferentes valores de “punto de corte” utilizados.

Implicaciones clínicas

El estudio de la etiología multifactorial y compleja de las enfermedades periodontales es de vital importancia para aplicar una adecuada monitorización y tratamiento de las mismas. El conocimiento de los aspectos microbiológicos y de la prevalencia de la periodontitis es relevante ya que se ha visto que existe variabilidad entre países. A pesar de la demostrada relación entre la presencia de *A. actinomycetemcomitans* y la periodontitis agresiva en Marruecos, la evidencia es escasa a este respecto. Dichas diferencias en la prevalencia de la periodontitis parecen estar relacionadas con las distintas capacidades virulentas de las especies bacterianas en países vecinos como España y Marruecos, por lo que la caracterización, en términos de factores de virulencia de las bacterias, concretamente de *A. actinomycetemcomitans* es primordial para entender el papel que este periodonto-patógeno tiene en la periodontitis agresiva y ayudarnos a guiar nuestras decisiones terapéuticas.

Para evitar el uso irracional de los antibióticos sistémicos en nuestra práctica clínica, se debe conocer la respuesta de los periodonto-patógenos a distintos antimicrobianos *in vitro*, particularmente de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* ya que ambos han demostrado una evidencia de asociación fuerte con las enfermedades periodontales.

Implicaciones para investigaciones futuras

Como se ha dicho anteriormente, el comportamiento de las bacterias varía si se encuentran en su forma planctónica o incluidas en un biofilm, por lo que, para evidenciar la efectividad clínica del uso coadyuvante de los antibióticos sistémicos en el tratamiento de la periodontitis, el siguiente paso sería estudiar la respuesta a dicho tratamiento de los pacientes con periodontitis asociada a *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* mediante un ensayo clínico aleatorizado, particularmente en la población marroquí, en la que no existe ningún artículo previo que haya analizado esta cuestión.

IV. CONCLUSIONES

Este trabajo ha demostrado la relevancia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en la etiología de la periodontitis en España y Marruecos, con diferencias en la prevalencia y en la variabilidad genética de *A. actinomycetemcomitans*, y con mayores resistencias antimicrobianas en Marruecos para cepas de *A. actinomycetemcomitans*.

En España, la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* fue baja (5.7%). Los serotipos más frecuentes fueron “a” y “b”, sin detectarse cepas del clon JP2. El operón que codifica para la Cdt fue observado en el 65.8% de las muestras.

En Marruecos, *A. actinomycetemcomitans* se encontró en un 35.6% de los casos. Las cepas estudiadas presentaron predominantemente el serotipo “b”. El 78% de las cepas fueron positivas para el operón que codifica para la Cdt y el 12.2% presentaron un resultado positivo para el clon JP2.

En la muestra de pacientes marroquíes, se confirmó la asociación de *A. actinomycetemcomitans* con la periodontitis agresiva localizada y generalizada, mientras *P. gingivalis* se asoció con la periodontitis agresiva generalizada.

En el estudio de las susceptibilidades a antimicrobianos mediante E-test® en Marruecos, *P. gingivalis* mostró susceptibilidad frente a todos los agentes evaluados, mientras que *A. actinomycetemcomitans* mostró resistencia frente a metronidazol (61.7%) y azitromicina (28%).

IV. BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, C., Antonoglou, G., Haubek, D., Kwamin, F., Claesson, R. & Johansson, A. (2013) Cytolethal distending toxin in isolates of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* from Ghanaian adolescents and association with serotype and disease progression. *PLoS One* **8**, e65781.
- Aberg, C. H., Kwamin, F., Claesson, R., Johansson, A. & Haubek, D. (2012) Presence of JP2 and Non-JP2 Genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and attachment loss in adolescents in Ghana. *J Periodontol* **83**, 1520-1528.
- Alberti, K. G., Zimmet, P. & Shaw, J. (2005) The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* **366**, 1059-1062.
- AlJehani, Y. A. (2014) Risk factors of periodontal disease: review of the literature. *Int J Dent* **2014**, 182-513.
- Alsina, M., Olle, E. & Frias, J. (2001) Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* **39**, 509-513.
- Ardila, C. M., Granada, M. I. & Guzman, I. C. (2010) Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res* **45**, 557-563.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6.
- Armitage, G. C. & Cullinan, M. P. (2010) Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* **53**, 12-27.
- Asikainen, S., Lai, C. H., Alaluusua, S. & Slots, J. (1991) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* **6**, 115-118.
- Axelsson, P. & Lindhe, J. (1981) The significance of maintenance care in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* **8**, 281-294.
- Axelsson, P., Nystrom, B. & Lindhe, J. (2004) The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol* **31**, 749-757.
- Baehni, P. C., Tsai, C. C., McArthur, W. P., Hammond, B. F., Shenker, B. J. & Taichman, N. S. (1981) Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch Oral Biol* **26**, 671-676.
- Baelum, V., Luan, W. M., Chen, X. & Fejerskov, O. (1997) A 10-year study of the progression of destructive periodontal disease in adult and elderly Chinese. *J Periodontol* **68**, 1033-1042.

- Baker, P. J., Carter, S., Dixon, M., Evans, R. T. & Roopenian, D. C. (1999) Serum antibody response to oral infection precedes but does not prevent *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Oral Microbiol Immunol* **14**, 194-196.
- Baker, P. J., Evans, R. T. & Roopenian, D. C. (1994) Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol* **39**, 1035-1040.
- Bandhaya, P., Saraithong, P., Likittanasombat, K., Hengprasith, B. & Torrungruang, K. (2012) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes, the JP2 clone and cytolethal distending toxin genes in a Thai population. *J Clin Periodontol* **39**, 519-525.
- Benrachadi, L., Bouziane, A., Azziman, Z., Bouziane-Ouartini, F. & Ennibi, O. (2012) Screening for periodontopathogenic bacteria in severe chronic periodontitis in a Moroccan population. *Med Mal Infect* **42**, 599-602.
- Borges, I., Faveri, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Retamal-Valdes, B., Montenegro, S. C. & Feres, M. (2017) Different antibiotic protocols in the treatment of severe chronic periodontitis: a 1-year randomized trial. *J Clin Periodontol*. doi:10.1111/jcpe.12721.
- Borgnakke, W. S. (2015) Does Treatment of Periodontal Disease Influence Systemic Disease? *Dent Clin North Am* **59**, 885-917.
- Borrell, L. N. & Papapanou, P. N. (2005) Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* **32 Suppl 6**, 132-158.
- Botero, J. E., Contreras, A., Lafaurie, G., Jaramillo, A., Betancourt, M. & Arce, R. M. (2007) Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J Periodontol* **78**, 696-704.
- Brayer, W. K., Mellonig, J. T., Dunlap, R. M., Marinak, K. W. & Carson, R. E. (1989) Scaling and root planing effectiveness: the effect of root surface access and operator experience. *J Periodontol* **60**, 67-72.
- Brigido, J. A., da Silveira, V. R., Rego, R. O. & Nogueira, N. A. (2014) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **19**, e184-191.
- Brogan, J. M., Lally, E. T., Poulsen, K., Kilian, M. & Demuth, D. R. (1994) Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect Immun* **62**, 501-508.
- Brown, L. F., Beck, J. D. & Rozier, R. G. (1994) Incidence of attachment loss in community-dwelling older adults. *J Periodontol* **65**, 316-323.
- Brown, L. J., Albandar, J. M., Brunelle, J. A. & Loe, H. (1996) Early-onset periodontitis: progression of attachment loss during 6 years. *J Periodontol* **67**, 968-975.

- Bueno, L. C., Mayer, M. P. & DiRienzo, J. M. (1998) Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. *J Periodontol* **69**, 998-1007.
- Celenigil, H. & Ebersole, J. L. (1998) Analysis of serum antibody responses to periodontopathogens in early-onset periodontitis patients from different geographical locations. *J Clin Periodontol* **25**, 994-1002.
- Chahboun, H., Arnau, M. M., Herrera, D., Sanz, M. & Ennibi, O. K. (2015) Bacterial profile of aggressive periodontitis in Morocco: a cross-sectional study. *BMC Oral Health* **15**, 25.
- Chahbouni, H., Maltouf, A. F. & Ennibi, O. (2013) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in aggressive periodontitis in Morocco -- preliminary study. *Odontostomatol Trop* **36**, 5-10.
- Chen, C., Wang, T. & Chen, W. (2010) Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. *Mol Oral Microbiol* **25**, 207-214.
- Claesson, R., Lagervall, M., Høglund-Aberg, C., Johansson, A. & Haubek, D. (2011) Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden. *J Clin Periodontol* **38**, 115-121.
- Claffey, N. & Egelberg, J. (1995) Clinical indicators of probing attachment loss following initial periodontal treatment in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **22**, 690-696.
- Colombo, A. P., Bennet, S., Cotton, S. L., Goodson, J. M., Kent, R., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Hasturk, H., Van Dyke, T. E., Dewhirst, F. E. & Paster, B. J. (2012) Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* **83**, 1279-1287.
- Colombo, A. P., Teles, R. P., Torres, M. C., Rosalem, W., Mendes, M. C., Souto, R. M. & Uzeda, M. (2005) Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol* **76**, 778-784.
- Corraini, P., Baelum, V., Pannuti, C. M., Romito, G. A., Aquino, D. R., Cortelli, S. C., Cortelli, J. R. & Pustiglioni, F. E. (2013) Subgingival microbial profiles as diagnostic markers of destructive periodontal diseases: a clinical epidemiology study. *Acta Odontol Scand* **71**, 289-299.
- Cortelli, J. R., Cortelli, S. C., Jordan, S., Haraszthy, V. I. & Zambon, J. J. (2005) Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **32**, 860-866.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.

- da Silva-Boghossian, C. M., do Souto, R. M., Luiz, R. R. & Colombo, A. P. (2011) Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol* **56**, 899-906.
- Dahlen, G. & Preus, H. R. (2017) Low antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacteria in periodontitis 5 years following metronidazole therapy. *Anaerobe* **43**, 94-98.
- de Araujo Neris, M., Cortelli, S. C., Aquino, D. R., de Miranda, T. B., Costa Fde, O. & Cortelli, J. R. (2015) *A. actinomycetemcomitans* profile and red complex bacterial species of an Afro-Brazilian community: A comparative study. *Arch Oral Biol* **60**, 753-759.
- De Geest, S., Laleman, I., Teughels, W., Dekeyser, C. & Quirynen, M. (2016) Periodontal diseases as a source of halitosis: a review of the evidence and treatment approaches for dentists and dental hygienists. *Periodontol 2000* **71**, 213-227.
- Dentino, A., Lee, S., Mailhot, J. & Hefti, A. F. (2013) Principles of periodontology. *Periodontol 2000* **61**, 16-53.
- Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Slade, G. D., Thornton-Evans, G. O., Borgnakke, W. S., Taylor, G. W., Page, R. C., Beck, J. D. & Genco, R. J. (2015) Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* **86**, 611-622.
- Elamin, A., Albandar, J. M., Poulsen, K., Ali, R. W. & Bakken, V. (2011) Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Sudanese patients with aggressive periodontitis: a case-control study. *J Periodontol Res* **46**, 285-291.
- Ennibi, O. K., Benrachadi, L., Bouziane, A., Haubek, D. & Poulsen, K. (2012) The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in localized and generalized forms of aggressive periodontitis. *Acta Odontol Scand* **70**, 318-322.
- Fabris, A. S., DiRienzo, J. M., Wikstrom, M. & Mayer, M. P. (2002) Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol Immunol* **17**, 231-238.
- Fabrizi, S., Leon, R., Blanc, V., Herrera, D. & Sanz, M. (2013) Variability of the *fimA* gene in *Porphyromonas gingivalis* isolated from periodontitis and non-periodontitis patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **18**, e100-105.
- Faveri, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Mestnik, M. J., Mayer, M. P. & Feres, M. (2009) Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* **36**, 739-749.
- Ferreira, M. C., Dias-Pereira, A. C., Branco-de-Almeida, L. S., Martins, C. C. & Paiva, S. M. (2017) Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. *J Periodontol Res*, n/a-n/a.
- Figuro, E., Carrillo-de-Albornoz, A., Martin, C., Tobias, A. & Herrera, D. (2013) Effect of pregnancy on gingival inflammation in systemically healthy women: a systematic review. *J Clin Periodontol* **40**, 457-473.

- Fine, D. H., Kaplan, J. B., Kachlany, S. C. & Schreiner, H. C. (2006) How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. *Periodontol 2000* **42**, 114-157.
- Gafan, G. P., Lucas, V. S., Roberts, G. J., Petrie, A., Wilson, M. & Spratt, D. A. (2004) Prevalence of periodontal pathogens in dental plaque of children. *J Clin Microbiol* **42**, 4141-4146.
- Gajardo, M., Silva, N., Gomez, L., Leon, R., Parra, B., Contreras, A. & Gamonal, J. (2005) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* **76**, 289-294.
- Genco, R. J. & Borgnakke, W. S. (2013) Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000* **62**, 59-94.
- Gootz, T. D. (2010) The global problem of antibiotic resistance. *Crit Rev Immunol* **30**, 79-93.
- Haffajee, A. D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N. J. & Socransky, S. S. (2004) Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* **31**, 996-1002.
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1997) The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **24**, 324-334.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**, 78-111.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003) Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol* **8**, 115-181.
- Haffajee, A. D., Teles, R. P. & Socransky, S. S. (2006) The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000* **42**, 219-258.
- Haraszthy, V. I., Hariharan, G., Tinoco, E. M., Cortelli, J. R., Lally, E. T., Davis, E. & Zambon, J. J. (2000) Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol* **71**, 912-922.
- Hasegawa, T., Watese H. (2004) Multiple risk factors of periodontal disease: a study of 9260 Japanese non-smokers. *Geriatr Gerontol Int* **4**, 37-43.
- Haubek, D. (2010) The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. *APMIS Suppl*, 1-53.
- Haubek, D., Dirienzo, J. M., Tinoco, E. M., Westergaard, J., Lopez, N. J., Chung, C. P., Poulsen, K. & Kilian, M. (1997) Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Microbiol* **35**, 3037-3042.

- Haubek, D., Ennibi, O. K., Poulsen, K., Poulsen, S., Benzarti, N. & Kilian, M. (2001) Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* **80**, 1580-1583.
- Haubek, D., Ennibi, O. K., Poulsen, K., Vaeth, M., Poulsen, S. & Kilian, M. (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* **371**, 237-242.
- Haubek, D., Poulsen, K., Westergaard, J., Dahlen, G. & Kilian, M. (1996) Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. *J Clin Microbiol* **34**, 1576-1578.
- Heller, D., Silva-Boghossian, C. M., do Souto, R. M. & Colombo, A. P. (2012) Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Arch Oral Biol* **57**, 973-980.
- Henderson, B., Ward, J. M. & Ready, D. (2010) *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol 2000* **54**, 78-105.
- Herrera, D., Alonso, B., Leon, R., Roldan, S. & Sanz, M. (2008) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol* **35**, 45-66.
- Herrera, D., Matesanz, P., Bascones-Martínez, A. & Sanz, M. (2012) Local and Systemic Antimicrobial Therapy in Periodontics. *J Evid Based Dent Pract* **12**, 50-60.
- Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldan, S. (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **29 Suppl 3**, 136-159; discussion 160-132.
- Herrera, D., van Winkelhoff, A. J., DelleMijn-Kippuw, N., Winkel, E. G. & Sanz, M. (2000) Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *J Clin Periodontol* **27**, 520-525.
- Hirschfeld, L. & Wasserman, B. (1978) A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol* **49**, 225-237.
- Holt, S. C. & Ebersole, J. L. (2005) *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000* **38**, 72-122.
- Holttä, P., Alaluusua, S., Saarela, M. & Asikainen, S. (1994) Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand J Dent Res* **102**, 113-119.
- Janket, S. J., Wightman, A., Baird, A. E., Van Dyke, T. E. & Jones, J. A. (2005) Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res* **84**, 1154-1159.

- Jansson, L. & Lavstedt, S. (2002) Influence of smoking on marginal bone loss and tooth loss--a prospective study over 20 years. *J Clin Periodontol* **29**, 750-756.
- Japoni, A., Vasin, A., Noushadi, S., Kiany, F., Japoni, S. & Alborzi, A. (2011) Antibacterial susceptibility patterns of *Porphyromonas gingivalis* isolated from chronic periodontitis patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **16**, e1031-1035.
- Jeffcoat, M. K. (1996) CONSENSUS REPORTS FROM THE 1996 WORLD WORKSHOP OF PERIODONTOLOGY *J Am Dent Assoc*.
- Jentsch, H., Cachovan, G., Guentsch, A., Eickholz, P., Pfister, W. & Eick, S. (2012) Characterization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains in periodontitis patients in Germany. *Clin Oral Investig* **16**, 1589-1597.
- Kaldahl, W. B., Kalkwarf, K. L., Patil, K. D., Molvar, M. P. & Dyer, J. K. (1996) Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol* **67**, 93-102.
- Kalkwarf, K. L., Kaldahl, W. B. & Patil, K. D. (1988) Evaluation of furcation region response to periodontal therapy. *J Periodontol* **59**, 794-804.
- Kaplan, J. B., Perry, M. B., MacLean, L. L., Furgang, D., Wilson, M. E. & Fine, D. H. (2001) Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun* **69**, 5375-5384.
- Kawada, M., Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Saito, T., Oho, T. & Koga, T. (2004) Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol* **19**, 289-292.
- Kim, T. S., Frank, P., Eickholz, P., Eick, S. & Kim, C. K. (2009) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *J Periodontol* **80**, 2020-2027.
- Knight, E. T., Liu, J., Seymour, G. J., Faggion, C. M., Jr. & Cullinan, M. P. (2016) Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000* **71**, 22-51.
- Kulik, E. M., Lenkeit, K., Chenaux, S. & Meyer, J. (2008) Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother* **61**, 1087-1091.
- Lally, E. T., Kieba, I. R., Demuth, D. R., Rosenbloom, J., Golub, E. E., Taichman, N. S. & Gibson, C. W. (1989) Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 256-262.
- Lamster, I. B., Kaluszhner-Shapira, I., Herrera-Abreu, M., Sinha, R. & Grbic, J. T. (1998) Serum IgG antibody response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: implications for periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol* **25**, 510-516.
- Lang, N. P. & Tonetti, M. S. (2003) Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health Prev Dent* **1**, 7-16.

- Lara-Tejero, M. & Galan, J. E. (2001) CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun* **69**, 4358-4365.
- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martin, C. & Silva, A. (2004) Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* **31**, 1061-1069.
- Leung, W. K., Ngai, V. K., Yau, J. Y., Cheung, B. P., Tsang, P. W. & Corbet, E. F. (2005) Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from young Chinese aggressive periodontitis patients. *J Periodontol Res* **40**, 258-268.
- Lim, L. P., Tay, F. B. K., Sum, C. F. & Thai, A. C. (2007) Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* **34**, 118-123.
- Llambes, F., Arias-Herrera, S. & Caffesse, R. (2015) Relationship between diabetes and periodontal infection. *World J Diabetes* **6**, 927-935.
- Llodrá, C. (2012) "Encuesta de Salud Oral en España". RCOE **17**, 13-46.
- Loesche, W. J. (1979) Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res* **58**, 2404-2412.
- Lopez, N. J., Mellado, J. C., Giglio, M. S. & Leighton, G. X. (1995) Occurrence of certain bacterial species and morphotypes in juvenile periodontitis in Chile. *J Periodontol* **66**, 559-567.
- Lourenco, T. G., Heller, D., Silva-Boghossian, C. M., Cotton, S. L., Paster, B. J. & Colombo, A. P. (2014) Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J Clin Periodontol* **41**, 1027-1036.
- Mahanonda, R., Seymour, G. J., Powell, L. W., Good, M. F. & Halliday, J. W. (1991) Effect of initial treatment of chronic inflammatory periodontal disease on the frequency of peripheral blood T-lymphocytes specific to periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* **6**, 221-227.
- Marsh, P. D. (2005) Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* **32**, 7-15.
- Matuliene, G., Studer, R., Lang, N. P., Schmidlin, K., Pjetursson, B. E., Salvi, G. E., Bragger, U. & Zwahlen, M. (2010) Significance of Periodontal Risk Assessment in the recurrence of periodontitis and tooth loss. *J Clin Periodontol* **37**, 191-199.
- Mealey, B. L. & Oates, T. W. (2006) Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* **77**, 1289-1303.
- Meyer, D. H., Mintz, K. P. & Fives-Taylor, P. M. (1997) Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol Med* **8**, 389-409.

- Minguez, M., Ennibi, O. K., Pousa, X., Lakhdar, L., Abdellaoui, L., Sanchez, M., Sanz, M. & Herrera, D. (2016) Characterization of *A. actinomycetemcomitans* strains in subgingival samples from periodontitis subjects in Morocco. *Clin Oral Investig* **20**, 1809-1818.
- Minguez, M., Pousa, X., Herrera, D., Blasi, A., Sanchez, M. C., Leon, R. & Sanz, M. (2014) Characterization and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from a population of periodontitis patients in Spain. *Arch Oral Biol* **59**, 1359-1367.
- Mombelli, A., Casagni, F. & Madianos, P. N. (2002) Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* **29 Suppl 3**, 10-21; discussion 37-18.
- Mombelli, A., Gmur, R., Frey, J., Meyer, J., Zee, K. Y., Tam, J. O., Lo, E. C., Di Rienzo, J., Lang, N. P. & Corbet, E. F. (1998) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in young Chinese adults. *Oral Microbiol Immunol* **13**, 231-237.
- Mombelli, A., Gmur, R., Lang, N. P., Corbert, E. & Frey, J. (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. *J Clin Periodontol* **26**, 505-510.
- Mombelli, A., McNabb, H. & Lang, N. P. (1991) Black-pigmenting Gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *J Periodontal Res* **26**, 308-313.
- Nachnani, S., Scuteri, A., Newman, M. G., Avanesian, A. B. & Lomeli, S. L. (1992) E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *J Periodontol* **63**, 576-583.
- Norderyd, O., Hugoson, A. & Grusovin, G. (1999) Risk of severe periodontal disease in a Swedish adult population. A longitudinal study. *J Clin Periodontol* **26**, 608-615.
- Ogawa, T., McGhee, M. L., Moldoveanu, Z., Hamada, S., Mestecky, J., McGhee, J. R. & Kiyono, H. (1989) *Bacteroides*-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. *Clin Exp Immunol* **76**, 103-110.
- Ogunsalu, C., Daisley, H. & Akpaka, P. E. (2011) Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of pathogens isolated from patients with juvenile periodontitis in Jamaica: a prospective multi-centre study of 15 cases over a 15-year period. *West Indian Med J* **60**, 235-239.
- Orru, G., Marini, M. F., Ciusa, M. L., Isola, D., Cotti, M., Baldoni, M., Piras, V., Pisano, E. & Montaldo, C. (2006) Usefulness of real time PCR for the differentiation and quantification of 652 and JP2 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in dental plaque and saliva. *BMC Infect Dis* **6**, 98.
- Papapanou, P. N. (1996) Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* **1**, 1-36.
- Papapanou, P. N. (2002) Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol* **7**, 54-61.

- Papapanou, P. N., Madianos, P. N., Dahlén, G. & Sandros, J. (1997) "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur J Oral Sci* **105**, 389-396.
- Pavičić, M. J. A. M. P., van Winkelhoff, A. J., Douqué, N. H., Steures, R. W. R. & de Graaff, J. (1994) Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol* **21**, 107-112.
- Peruzzo, D. C., Benatti, B. B., Ambrosano, G. M., Nogueira-Filho, G. R., Sallum, E. A., Casati, M. Z. & Nociti, F. H., Jr. (2007) A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. *J Periodontol* **78**, 1491-1504.
- Psoter, W. J., Ge, Y., Russell, S. L., Chen, Z., Katz, R. V., Jean-Charles, G. & Li, Y. (2011) PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in dental plaque samples from Haitian adolescents. *Clin Oral Investig* **15**, 461-469.
- Ragnarsson, E., Eliasson, S. T. & Olafsson, S. H. (1992) Tobacco smoking, a factor in tooth loss in Reykjavik, Iceland. *Scand J Dent Res* **100**, 322-326.
- Rams, T. E., Dujardin, S., Sautter, J. D., Degener, J. E. & van Winkelhoff, A. J. (2011) Spiramycin resistance in human periodontitis microbiota. *Anaerobe* **17**, 201-205.
- Rams, T. E., Listgarten, M. A. & Slots, J. (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* subgingival presence, species-specific serum immunoglobulin G antibody levels, and periodontitis disease recurrence. *J Periodontal Res* **41**, 228-234.
- Renatus, A., Herrmann, J., Schonfelder, A., Schwarzenberger, F. & Jentsch, H. (2016) Clinical Efficacy of Azithromycin as an Adjunctive Therapy to Non-Surgical Periodontal Treatment of Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Diagn Res* **10**, ZE01-07.
- Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J. & Egelberg, J. (1990) Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* **17**, 345-350.
- Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J. & Egelberg, J. (1990) On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* **17**, 351-355.
- Restaino, C. G., Chaparro, A., Valenzuela, M. A., Kettlun, A. M., Vernal, R., Silva, A., Puente, J., Jaque, M. P., Leon, R. & Gamonal, J. (2007) Stimulatory response of neutrophils from periodontitis patients with periodontal pathogens. *Oral Dis* **13**, 474-481.
- Rodenburg, J. P., van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G., Goene, R. J., Abbas, F. & de Graff, J. (1990) Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* **17**, 392-399.
- Roman-Torres, C. V., Aquino, D. R., Cortelli, S. C., Franco, G. C., Dos Santos, J. G., Corraini, P., Holzhausen, M., Diniz, M. G., Gomez, R. S. & Cortelli, J. R. (2010) Prevalence and

- distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Arch Oral Biol* **55**, 242-248.
- Rosen, G., Nisimov, I., Helcer, M. & Sela, M. N. (2003) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b lipopolysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun* **71**, 3652-3656.
- Rurenga, P., Raangs, E., Singadji, Z., Wekema-Mulder, G., Veloo, A. C. & van Winkelhoff, A. J. (2013) Evaluation of three selective media for isolation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontol Res* **48**, 549-552.
- Rylev, M. & Kilian, M. (2008) Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol* **35**, 346-361.
- Saarela, M., Asikainen, S., Alaluusua, S., Pyhala, L., Lai, C. H. & Jousimies-Somer, H. (1992) Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol Immunol* **7**, 277-279.
- Sakellari, D., Katsikari, A., Slini, T., Ioannidis, I., Konstantinidis, A. & Arsenakis, M. (2011) Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *J Clin Periodontol* **38**, 108-114.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M. & Silva, A. (2004) Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* **31**, 1034-1047.
- Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., DelleMijn-Kippuw, N., Simon, R. & Winkel, E. (2000) Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* **108**, 383-392.
- Schacher, B., Baron, F., Rossberg, M., Wohlfeil, M., Arndt, R. & Eickholz, P. (2007) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J Clin Periodontol* **34**, 566-573.
- Shanmugam, M., Gopal, P., El Abbar, F., Schreiner, H. C., Kaplan, J. B., Fine, D. H. & Ramasubbu, N. (2015) Role of exopolysaccharide in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced bone resorption in a rat model for periodontal disease. *PLoS One* **10**, e0117487.
- Sharma, V., Sharma, A., Kumar, V. & Aggarwal, S. (2009) Disulfiram-like reaction with ornidazole. *J Postgrad Med* **55**, 292-293.
- Shiloah, J. & Patters, M. R. (1994) DNA probe analyses of the survival of selected periodontal pathogens following scaling, root planing, and intra-pocket irrigation. *J Periodontol* **65**, 568-575.
- Slots, J. (1999) Update on *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. *J Int Acad Periodontol* **1**, 121-126.

- Slots, J., Feik, D. & Rams, T. E. (1990) Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides intermedius in human periodontitis: age relationship and mutual association. *J Clin Periodontol* **17**, 659-662.
- Soares, G. M., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Cortelli, S. C., Duarte, P. M. & Feres, M. (2012) Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci* **20**, 295-309.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* **63**, 322-331.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* **38**, 135-187.
- Stevens, R. H., Lillard, S. E. & Hammond, B. F. (1987) Purification and biochemical properties of a bacteriocin from Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun* **55**, 692-697.
- Stingu, C. S., Jentsch, H., Eick, S., Schaumann, R., Knofler, G. & Rodloff, A. (2012) Microbial profile of patients with periodontitis compared with healthy subjects. *Quintessence Int* **43**, e23-31.
- Suzuki, N., Nakano, Y. & Kiyoura, Y. (2006) Characterizing the specific coaggregation between Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype c strains and Porphyromonas gingivalis ATCC 33277. *Oral Microbiol Immunol* **21**, 385-391.
- Taichman, N. S., Dean, R. T. & Sanderson, C. J. (1980) Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun* **28**, 258-268.
- Takamatsu, N., Yano, K., He, T., Umeda, M. & Ishikawa, I. (1999) Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis, and Actinobacillus actinomycetemcomitans. *J Periodontol* **70**, 574-580.
- Tan, K. S., Woo, C. H., Ong, G. & Song, K. P. (2001) Prevalence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in an ethnic adult Chinese population. *J Clin Periodontol* **28**, 886-890.
- Taubman, M. A., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Smith, D. J. & Ebersole, J. L. (1992) Longitudinal monitoring of humoral antibody in subjects with destructive periodontal diseases. *J Periodontol Res* **27**, 511-521.
- Taylor, G. W., Burt, B. A., Becker, M. P., Genco, R. J., Shlossman, M., Knowler, W. C. & Pettitt, D. J. (1996) Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* **67**, 1085-1093.
- Teixeira, R. E., Mendes, E. N., Roque de Carvalho, M. A., Nicoli, J. R., Farias Lde, M. & Magalhaes, P. P. (2006) Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Can J Microbiol* **52**, 182-188.
- Theilade, E. (1986) The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **13**, 905-911.

- Thiha, K., Takeuchi, Y., Umeda, M., Huang, Y., Ohnishi, M. & Ishikawa, I. (2007) Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* **22**, 201-207.
- Thomas, R. Z., Loos, B. G., Teeuw, W., Kunnen, A., van Winkelhoff, A. J. & Abbas, F. (2015) Periodontitis and systemic diseases: from science to clinical practice. *Ned Tijdschr Tandheelkd* **122**, 542-548.
- Timmerman, M. F., Van der Weijden, G. A., Arief, E. M., Armand, S., Abbas, F., Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J. & Van der Velden, U. (2001) Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* **28**, 617-627.
- Tomita, S., Komiya-Ito, A., Imamura, K., Kita, D., Ota, K., Takayama, S., Makino-Oi, A., Kinumatsu, T., Ota, M. & Saito, A. (2013) Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. *Microb Pathog* **61-62**, 11-15.
- Tonetti, M. S. & Mombelli, A. (1999) Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* **4**, 39-53.
- Tsai, C., Hayes, C. & Taylor, G. W. (2002) Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol* **30**, 182-192.
- Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, J. L. & Slots, J. (1998) Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol* **69**, 1111-1118.
- van der Reijden, W. A., Brunner, J., Bosch-Tijhof, C. J., van Trappen, S., Rijnsburger, M. C., de Graaff, M. P., van Winkelhoff, A. J., Cleenwerck, I. & de Vos, P. (2010) Phylogenetic variation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype e reveals an aberrant distinct evolutionary stable lineage. *Infect Genet Evol* **10**, 1124-1131.
- Van der Velden, U., Abbas, F., Armand, S., Loos, B. G., Timmerman, M. F., Van der Weijden, G. A., Van Winkelhoff, A. J. & Winkel, E. G. (2006) Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol* **33**, 540-548.
- van der Weijden, G. A., de Slegte, C., Timmerman, M. F. & van der Velden, U. (2001) Periodontitis in smokers and non-smokers: intra-oral distribution of pockets. *J Clin Periodontol* **28**, 955-960.
- Van Winkelhoff, A. J., Gonzales, D. H., Winkel, E. G., DelleMijn-Kippuw, N., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. & Sanz, M. (2000) Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* **27**, 79-86.
- Van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Oteo, A. & Sanz, M. (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* **32**, 893-898.

- Veloo, A. C., Seme, K., Raangs, E., Rurenga, P., Singadji, Z., Wekema-Mulder, G. & van Winkelhoff, A. J. (2012) Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *Int J Antimicrob Agents* **40**, 450-454.
- Venketaraman, Lin AK, Le A, Kachlany SC, Connell ND & JB., K. (2008) Both leukotoxin and poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide protect *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cells from macrophage killing. *Microb Pathog* **45**, 173-180.
- von Troil, B., Needleman, I. & Sanz, M. (2002) A systematic review of the prevalence of root sensitivity following periodontal therapy. *J Clin Periodontol* **29 Suppl 3**, 173-177; discussion 195-176.
- Walmsley, A. D., Lea, S. C., Landini, G. & Moses, A. J. (2008) Advances in power driven pocket/root instrumentation. *J Clin Periodontol* **35**, 22-28.
- Wang, D., Kawashima, Y., Nagasawa, T., Takeuchi, Y., Kojima, T., Umeda, M., Oda, S. & Ishikawa, I. (2005) Elevated serum IgG titer and avidity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype c in Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* **20**, 172-179.
- Winkelhoff, A. J. V., Rams, T. E. & Slots, J. (1996) Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000* **10**, 45-78.
- Ximenez-Fyvie, L. A., Almaguer-Flores, A., Jacobo-Soto, V., Lara-Cordoba, M., Sanchez-Vargas, L. O. & Alcantara-Maruri, E. (2006) Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J Periodontol* **77**, 460-471.
- Yang, H. W., Huang, Y. F., Chan, Y. & Chou, M. Y. (2005) Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci* **113**, 28-33.
- Yoshida, Y., Suzuki, N., Nakano, Y., Shibuya, K., Ogawa, Y. & Koga, T. (2003) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiol Immunol* **18**, 135-139.
- Zambon, J. J., DeLuca, C., Slots, J. & Genco, R. J. (1983) Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect Immun* **40**, 205-212.